



UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA



CSIC
CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS



TESIS DOCTORAL

USO DE BLOQUES MULTINUTRIENTES DE DESTRIOS DE TOMATE Y PEPINO COMO ALTERNATIVA AL CONCENTRADO EN LA DIETA DE CAPRINO

EFFECTOS SOBRE LA FERMENTACIÓN Y MICROBIOTA RUMINAL, LA
UTILIZACIÓN DE NUTRIENTES Y LA PRODUCCIÓN Y COMPOSICIÓN DE LA
LECHE

UTILIZATION OF MULTINUTRIENT BLOCKS INCLUDING TOMATO AND CUCUMBER WASTE FRUITS AS AN ALTERNATIVE TO THE CONCENTRATE IN GOAT DIETS

*EFFECTS ON RUMINAL FERMENTATION AND MICROBIOTA, NUTRIENTS
UTILIZATION AND MILK YIELD AND COMPOSITION*

Manuel Romero Huelva

Granada, 2012

TÍTULO: Uso de bloques multinutrientes de destrios de tomate y pepino como alternativa al concentrado en la dieta de caprino. Efectos sobre la fermentación y microbiota ruminal, la utilización de nutrientes y la producción y composición de la leche

AUTOR: Manuel Romero Huelva

© Edita: Servicio de Publicaciones de la Universidad de Córdoba. 2012
Campus de Rabanales Ctra. Nacional IV, Km. 396 A
14071 Córdoba

www.uco.es/publicaciones
publicaciones@uco.es

Los trabajos que componen esta memoria han sido financiados por la Junta de Andalucía (Proyectos de Excelencia P05-AGR-00408 y P07-RNM-02746). El autor ha disfrutado de una ayuda del programa JAE-predoc del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC).

Los trabajos de investigación que se exponen en la Memoria de Tesis Doctoral titulada “Uso de bloques multinutrientes de desechos de tomate y pepino como alternativa al concentrado en la dieta de caprino: efectos sobre la fermentación y microbiota ruminal, la utilización de nutrientes y la producción y composición de la leche” han sido realizados bajo mi dirección por el Licenciado Manuel Romero Huelva para aspirar al grado de Doctor dentro del Programa de Doctorado “Zootecnia y Gestión Sostenible: Ovino y Caprino” de la Universidad de Córdoba. Esta memoria refleja fielmente los resultados obtenidos.

Dra. Eduarda Molina Alcaide

Departamento de Fisiología y Bioquímica de la Nutrición Animal

Estación Experimental del Zaidín (CSIC)

Granada

Licenciado Manuel Romero Huelva

Granada 2012

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

- Romero-Huelva, M., Martín-García, A.I., Nogales, R., and Molina-Alcaide, E. 2009. Efecto de cenizas procedentes de la obtención de energía renovable a partir de biomasa residual sobre la fermentación ruminal in vitro de dietas basadas en heno de alfalfa. En: XIII Jornadas sobre Producción Animal. Vol 1: 310-312. ISBN 9788461323111. Ed. Asociación Interprofesional para el Desarrollo Agrario. Zaragoza.
- Romero-Huelva, M., Martín-García, A.I., Nogales, R., and Molina-Alcaide, E. 2010. Effect of the type and level of concentrate substitution with feed blocks on the ruminal fermentation of diets based on alfalfa hay in batch cultures. En: Gut Microbiology: new insights into gut microbial ecosystems. 7th Rowett-INRA Joint Symposium. Aberdeen, Reino Unido. 23-25 Junio. Pag. 105.
- Romero-Huelva, M., Martín-García, A.I., Nogales, R., and Molina-Alcaide, E. 2011. Effect of ash from different residual biomass used to obtain renewable energy on ruminal fermentation of diets based on wheat straw in batch cultures. Options Méditerranéennes, Série A. No 99: 259-265. ISSN 1016-121X.
- Romero-Huelva, M., Martín-García, A.I., Nogales, R., and Molina-Alcaide, E. 2011. Efecto de la sustitución parcial de concentrado por bloques multinutrientes que incluyen destríos de invernaderos sobre la fermentación ruminal y la utilización de nutrientes en caprino. En: XIV Jornadas sobre Producción Animal. Vol 1: 213-215. ISBN 9788461500628. Ed. Asociación Interprofesional para el Desarrollo Agrario. Zaragoza.
- Romero-Huelva, M., Martín-García, A.I., Nogales, R., and Molina-Alcaide, E. 2011. Alimentación de rumiantes: destríos de invernadero como alimento sostenible. Albéitar: publicación veterinaria independiente. No 151: 36-38.
- Nogales, R., Delgado, G., Quirantes, M., Romero-Huelva, M., Romero, E., and Molina-Alcaide, E. 2011. Characterization of olive waste ashes as fertilizers. En: Recycling of biomass wastes. Pag. 57-68. DOI: 10.1007/978-3-642-19354-5_5.
- Romero-Huelva, M., Ramos-Morales, E., Martín-García, A.I., Nogales, R. and Molina-Alcaide, E. 2011. Effect of the partial replacement of concentrate with feed blocks including greenhouse wastes on ruminal fermentation and methane production in dairy goats. 8th International Symposium on the Nutrition of Herbivores. Aberystwyth, Reino Unido. 06-09 Septiembre. Pag. 566.
- Romero-Huelva, M., Wright, A-D.G., and Molina-Alcaide, E. 2012. Effect of concentrate replacement with feed blocks including wastes from greenhouse horticulture on methane emissions and microbial abundances in goats. 8th INRA-Rowett Symposium on Gut Microbiology. Clermont-Ferrand, France. 17-20 Junio.



TÍTULO DE LA TESIS: “USO DE BLOQUES MULTINUTRIENTES DE DESTRIOS DE TOMATE Y PEPINO COMO ALTERNATIVA AL CONCENTRADO EN LA DIETA DE CAPRINO: EFECTOS SOBRE LA FERMENTACIÓN Y MICROBIOTA RUMINAL, LA UTILIZACIÓN DE NUTRIENTES Y LA PRODUCCIÓN Y COMPOSICIÓN DE LA LECHE”

DOCTORANDO/A: MANUEL ROMERO HUELVA

INFORME RAZONADO DEL/DE LOS DIRECTOR/ES DE LA TESIS

(se hará mención a la evolución y desarrollo de la tesis, así como a trabajos y publicaciones derivados de la misma).

Los trabajos de esta tesis, realizados bajo mi dirección, se han desarrollado en el plazo de los 4 años de beca-contrato con que el doctorando contaba. Ha existido una evolución clara desde el principio tanto en la capacidad del doctorando para entender los objetivos y planteamientos de los trabajos como para abordar dichos objetivos con metodologías adecuadas y analizar y discutir los resultados.

La evolución en la capacidad científica del doctorando se refleja en las publicaciones obtenidas, tanto en revistas como en libros. Los trabajos realizados in vitro así como con cabras en mantenimiento y en lactación han dado lugar a 3 publicaciones en revistas SCI del mayor prestigio.

Por todo ello, se autoriza la presentación de la tesis doctoral.

Córdoba, 17 de Mayo de 2012

Firma del/de los director/es

Fdo.: EDUARDA MOLINA ALCAIDE

AGRADECIMIENTOS

Durante la realización de mi tesis doctoral he tenido la oportunidad de trabajar, conocer y entablar amistad con muchas personas sin las cuales esta tesis no habría sido posible. A todos ellos, quiero dar las gracias sinceramente y espero que no me guarden rencor por los sustos y bromas a los que les he sometido durante estos años, muchos de los cuales son dignos de patente:

A mi directora de tesis Eduarda Molina Alcaide, por su dedicación, trabajo y esfuerzo, que son de admirar y que me han permitido no solo terminar esta tesis sino también sacarle partido y formarme mejor profesionalmente y como persona. Gracias por darme la oportunidad de trabajar en tu grupo y por enseñarme a ser más humilde y a tener en cuenta la voz de la experiencia: “*Si he podido ver más allá que otros es porque me he apoyado en los hombros de los gigantes que me precedieron*”. Personalmente, tengo que decir que ha sido un placer trabajar contigo: “*Viva la Mancha y sus manchegas!*”

A Manuel Pérez Hernández por sus consejos, apoyo y confianza. Gracias por animarme a introducirme en el apasionante mundo de la nutrición animal y la investigación. A todos los miembros del Departamento de Producción Animal de la Universidad de Córdoba por haberme tratado siempre como uno más, y en especial a Antón García, Jose Perea y Daniel Valerio que siempre han confiado en mi y con los que he disfrutado de momentos inolvidables.

Al programa de becas JAE predoctorales del CSIC por haberme concedido una ayuda económica para la realización de este trabajo. Al programa de Proyectos de Excelencia de la Junta de Andalucía, que ha subvencionado los dos proyectos en cuyo marco se han desarrollado los trabajos de esta tesis.

A Rogelio Nogales Vargas-Machuca “hombre de los dineros”, investigador principal de los mencionados proyectos y a todos los integrantes de su grupo. A la planta de residuos de Motril, por facilitarnos la recogida de subproductos y por obsequiarnos en numerosas ocasiones de vermicompost de buenisísima calidad.

A Julia y Tamara, por su gran colaboración en la realización de los ensayos y análisis que componen esta tesis. Gracias por ser mis maestras en el laboratorio, y por ser las mejores compañeras de trabajo y amigas. Sinceramente, no os cambiaría por nada del mundo. Nunca olvidaré todas las risas, cotilleos, tapillas y momentos que hemos pasado juntos, aunque espero que nos queden muchos más.

A Remedios Sanz y Francisca Gil por ser siempre tan claras y darle esa alegría y toque de humor al día a día, sobre todo en las cenas y comidas de grupo. No hay quien os pare cuando os arrancais a contar batallitas y chistes.

A Ignacio Martín (*Danke Captain*) y David Yañez, por su apoyo y consejos. Gracias por vuestra colaboración, sobre todo en la preparación de sustos y bromas con culebras, cajas gigantes, y hielo seco que siempre han tenido resultados espectaculares con Eva Soto.

Peee, peeee...! Como se me iba a olvidar Paco Fune, por esas mañanas que hemos pasado ordeñando a las cabritas y dándoles de comer, que risas nos hemos echado juntos tío! Muchas gracias por estar siempre dispuesto a ayudarme cuando lo he necesitado, por tus consejos y por enseñarme que todo el saber no está en los libros, hay que salir al campo para escuchar y aprender de aquellos que tienen la experiencia.

A Gonzalo Martínez, Gonzalo Cantalapiedra, Pablo, Eva Soto, Eva Ramos, Leti, sin vosotros tampoco habría sido posible esta tesis y mucho menos la última colaboración con

Ørskov en el congreso de Gales. Gracias por vuestros consejos, apoyo, discusiones sobre ciencia, y sobre todo por los viernes de tapas y los buenos momentos que hemos pasado juntos en laboratorio, el Piyayo, la Castañuela, House Café, Mae West, etc. A los demás técnicos y prácticos que, en numerosas ocasiones, han prestado sus manos y buena disposición, en especial a Isa, Eli, Nuria y Ana Arco.

A Manuel Lachica por su ofrecimiento, ayuda y consejos durante la canulación de los animales que usamos en los experimentos de esta Tesis y a todos los integrantes del grupo de Minerales por sus consejos y ayuda sobre “minerales y efectos antioxidantes” en la realización de los experimentos. A Luis Lara y Alejandro por rescatarme de más de un problema estadístico e informático, y por la gran cantidad de herramientas que me han enseñado a usar tanto a nivel profesional como lúdico-festivo. La tecnología da mucho juego y sobre todo los mensajes instantáneos y altavoces de los teléfonos.

A Juan Vera, por hacer que todo funcione siempre que se necesita. A Rafa Hueso por integrarme en la peña de “los huesos” y enseñarme a usar todas las tecnologías y aparatos que he necesitado durante los análisis de mis muestras, aunque no me ha quedado claro como se hace un análisis de masas, masas, masas!

A todos los miembros del departamento, en especial a la comunidad becaria y técnica Arancha, Jose, Lucre, M^a Luz, M^a Jesus, Ana Haro, Migue, Rocío, Bea, Alicia, Rebeca, Rosa, e Irene, por hacer de este departamento un lugar especial, por vuestra ayuda, por todas las tertulias filosóficas y mundanas, y por los fantásticos momentos compartidos.

A Pedro, Antonio y Ricardo, los chicos que siempre velan por la seguridad del centro y con los que siempre he disfrutado de buenos momentos y estupendas conversaciones.

Al grupo de investigación “Microbial Biochemistry” del “Rowett Research Institute” de la Universidad de Aberdeen, en especial a John Wallace, Dinesh Thapa, Nest McKain, Tonny Richardson, y en especial a Eva Ramos por ayudar a hacer posible mi estancia en Escocia, por ser mi anfitrión de laboratorio cuando más perdida estaba. A la pequeña colonia andaluza de Aberdeen: Eva, David, Cristina y Antonio “*Oh my god mirua!*”; y a los estudiantes, “*the Rowett gang*” (Maša, Anna, Mireia, Luz, Ray, Dinesh, Matei, Eddy, Modou, Andrea y Alex) por su amistad más allá del espacio y el tiempo, y sobre todo por participar en la liga de fútbol más cañera e internacional que ha habido en el Rowett y que tendremos que volver a celebrar en el césped de Strathcona House.

A los miembros del departamento “*Animal Science*” de la Universidad de Vermont, en especial a André Denis G. Wright por su hospitalidad y por tener siempre un hueco para mí en su apretada agenda para discutir sobre el maravilloso mundo de lo molecular, y también sobre tenis, fútbol americano, vinos y comida!. A la comunidad andaluza de Burlington, Jaime y Eduardo, por ser tan geniales y hacerme sentir como en casa durante estos meses. A Dan Kelleher, que ha sido el mejor compañero de piso que he tenido en USA y con el que he disfrutado de momentos inolvidables, “*Dibs?*”. A todos los estudiantes del departamento, Sue, Rachel, Benoit, Mital, Aimee, Amanda, Ben, Shi, Young. A todos los miembros de la “Grad Student Society”, con los que he disfrutado de pizza gratis todos los miércoles. A la peña de “Henderson Café” y “Uncommon Ground”, por tener siempre un chocolatinillo preparado para mí.

A mis compis de piso Isaac, Gonzalazo, Petar Popov y Joan, gracias por haberme hecho mi estancia en Granada tan divertida y por todas aquellas anécdotas e historias que hemos compartido durante estos años (lanzamiento de cuchillos, tapitas, barbacoas, amores y desamores, y visitas al House Café), de verdad chicos que no podría haber sido mejor.

Amigos y amigas de Huelva en especial Jesus, Miguel, Loren, David; y a mis compis de veterinaria, en especial Alberto el “Lebrijano”, Manuel Melcon “El Tiri”, Germán, Alfonsito, Ana “La Portu”, Isa “La Chunga”, Isa “La Rubia” y a todos los “*Rabanetas*” de la residencia Lucano.

A toda mi familia por ser tan especial y divertida, en especial a mi madre y hermanos, que siempre me han apoyado y gracias a su trabajo y consejos he conseguido a ser la persona que soy hoy, os quiero! A Julita, Alberto, Vigi y Elias, Poppy y Rony, mi familia manchega, con la que disfruto de momentos inolvidables y con la que tengo el placer de compartir a la niña que más quiero del mundo y que me encanta ;)

*“Algunos alcanzan el éxito porque están destinados a ello,
pero la gran mayoría lo consigue por su trabajo y esfuerzo”*

Dan Kelleher

*A mi madre, hermanos y
a mi macheguita*

INDICE GENERAL

Capítulo 1. Introducción y Objetivos	<i>¡Error! Marcador no definido.</i>
1.1. INTRODUCTION AND OBJECTIVES.....	23
Capítulo 2. Revisión Bibliográfica	<i>¡Error! Marcador no definido.</i>
2.1. EL ANIMAL RUMIANTE	28
2.1.1. Importancia ecológica.....	28
2.1.2. Fermentación microbiana en el rumen.....	30
2.1.2.1. Anatomía y compartimentación en el rumen.....	30
2.1.2.2. Degradación de nutrientes en el rumen	32
2.1.2.3. Microbiota ruminal.....	34
2.1.2.4. Producción de metano y <i>Archaeas</i>	37
2.1.3. Síntesis de proteína microbiana	44
2.1.3.1. Excreción de derivados púricos en orina	455
2.2. EL SECTOR CAPRINO	46
2.2.1. Sistemas de producción e importancia socioeconómica	46
2.2.2. Alimentación del ganado caprino	49
2.2.2.1. Fluctuación en el precio de los cereales e impacto en la producción caprina.....	51
2.2.2.2. Estrategias para reducir el consumo de cereales en la alimentación del ganado caprino.	53
2.2.3. Utilización de subproductos en alimentación de rumiantes	54
2.2.3.1. Efectos digestivos y sobre la fermentación ruminal	56
2.2.3.2. Efecto sobre la producción de leche y su composición	58
2.2.3.2.1. Efecto sobre el perfil en ácidos grasos de la leche	61
2.2.3.2.2. Relación entre los ácidos grasos y las cualidades saludables de la leche.....	62
2.3. ESTUDIO DELA MICROBIOTA RUMINAL	66
2.3.1. Técnicas moleculares basadas en el gen ARNr 16S	67
2.3.2. Bases de datos.....	69
2.3.3. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	70
2.3.3.1. Cuantificación de grupos microbianos: PCR en tiempo real	71
2.3.4. Estudio de la biodiversidad digestiva: secuenciación de nueva generación.....	73
2.3.5. Análisis bioinformático y limitaciones del mismo.....	75
2.3.6. Inconvenientes y errores comunes asociados a la pirosecuenciación	76
2.3.7. Aplicaciones y futuro de las técnicas moleculares de nueva generación	78
Capítulo 3. Material y métodos	79
3.1. ANIMALES	80
3.1.1. Construcción e implantación quirúrgica de cánulas ruminales.....	80
3.2. DIETAS.....	82
3.3. CULTIVOS NO RENOVADOS DE MICROORGANISMOS RUMINALES (CNRMR).....	82
3.4. DESARROLLO EXPERIMENTAL.....	84
3.4.1. Experimento 1.....	84
3.4.2. Experimento 2:.....	84
3.4.3. Experimento 3.....	87

3.5. TÉCNICAS EXPERIMENTALES Y ANALÍTICAS	90
3.5.1. Preparación de las muestras y extracción de ADN	90
3.5.2. Reacción en Cadena de la Polimerasa en tiempo real o PCR cuantitativa.....	92
3.5.3. Pirosecuenciación 454 FLX-titanium	95
3.5.3.1. Construcción de librerías	95
3.5.3.1.1. Amplificación del ADN mediante PCR.....	96
3.5.3.1.2. Electroforesis, tinción, visualización y corte de bandas.....	98
3.5.3.1.3. Extracción, purificación del ADN del gel y preparación de la mezcla de muestras..	99
3.5.3.2. Emulsión de PCR	100
3.5.3.3. Pirosecuenciación y lectura de secuencias	101
3.5. TRATAMIENTO ESTADÍSTICO	104
Capítulo 4. Resultados.....	<i>¡Error! Marcador no definido.</i>
Publicación 1	168
Publicación 2	131
Publicación 3	146
Publicación 4.....	120
Capítulo 5. Discusión general.....	<i>¡Error! Marcador no definido.</i>
5.1. Efectos de distintos tipos de bloques multinutrientes, que contienen destríos de invernaderos y de distintos niveles de sustitución de concentrado sobre la fermentación ruminal <i>in vitro</i>	170
5.2. Potencial de los bloques multinutrientes, que incluyen subproductos de invernaderos, como estrategia alternativa al uso de concentrados en la dieta de caprino.....	172
5.2.1. Digestibilidad y balance de nutrientes	174
5.2.2. Fermentación ruminal y síntesis de proteína microbiana.....	178
5.2.3. Producción de metano y abundancia de bacterias y arqueas.....	187
5.2.4. Producción y composición de la leche.....	191
5.2.4.1. Proteína de la leche.....	193
5.2.4.2. Grasa láctea	195
Capítulo 6. Conclusiones.....	199
Conclusiones	200
Conclusions	202
Capítulo 7. Resumen.....	<i>¡Error! Marcador no definido.</i>
RESUMEN.....	205
SUMMARY	210
Capítulo 8. Bibliografía.....	215

LISTADO DE TABLAS

Tabla 2.1. Características de distintas especies de Archaeas metanogénicas.	39
Tabla 2.2. Principales estrategias estudiadas con objeto de reducir la producción de metano en rumiantes: mecanismos y consideraciones.	43
Tabla 2.3. Comparación de la composición en ácidos grasos de la leche (g/100 g ácidos grasos totales) de cabra, oveja y vaca alimentadas con dietas similares.....	64
Tabla 3.1. Composición de la disolución tampón (medio de Goering y van Soest, 1970 sin tripticasa) empleada para el experimento realizado con CNRMR.....	833
Tabla 3.2. Protocolo de amplificación y generación de la curva de disociación utilizados para la cuantificación de los grupos microbianos en las muestras correspondientes al experimento 1.	93
Tabla 3.3. Protocolo de amplificación y generación de la curva de disociación empleados para la cuantificación de los grupos microbianos en las muestras correspondientes a los experimentos 2 y 3.....	93
Tabla 3.4. Protocolo de amplificación del gen ARNr 16S de metanogénicas.	96
Tabla 3.5. Primers usados en la PCR para amplificar el gen ARNr 16S de archaeas metanogénicas.....	96
Tabla 3.6. Protocolo de amplificación de las regiones hipervariables del gen ARNr 16S de archaeas metanogénicas.	97
Tabla 3.7. Primers usados en la PCR para amplificar el gen ARNr 16S de archaeas metanogénicas.....	98
Tabla 4.1. Digestibilidad aparente de nutrientes (g / g) en cabras en mantenimiento y en lactación alimentadas con las dietas experimentales.....	108
Tabla 4.2. Balance de nitrógeno y energía en cabras en mantenimiento y en lactación alimentadas con las dietas experimentales.	110
Tabla 4.3. Parámetros de fermentación ruminal y flujo de nitrógeno microbiano y eficiencia en cabras en mantenimiento y en lactación alimentadas con las dietas experimentales.....	114
Tabla 4.4. Emisiones de metano y abundancia de bacterias y metanogénicas en el rumen de cabras canuladas en mantenimiento y en lactación alimentadas con las dietas experimentales.....	115
Tabla 4.5. Composición en aminoácidos de los ingredientes de la dieta.....	118
Tabla 4.6. Composición en aminoácidos de la leche de cabras alimentadas con las dietas experimentales ¹ (n = 8).	119

Tabla 5.1. Composición química de destríos de tomate y pepino en diferentes épocas del año 2008.....	170
Tabla 5.2. Composición en ingredientes (g/kg materia fresca) de los bloques multinutrientes utilizados en los ensayos in vitro en in vivo.....	173
Tabla 5.3. Ingesta y tasa de recuperación (g de FA excretados en leche /g de FA ingeridos) de ácidos grasos en cabras en lactación alimentadas con las dietas experimentales ¹ (n = 8)	198

LISTADO DE FIGURAS

Figura 2.1. Animales domésticos y de granja en el Antiguo Egipto.....	29
Figura 2.2. Digestión y absorción de carbohidratos en rumiantes.....	34
Figura 2.3. Bacterias, protozoos, hongos y virus del rumen.	35
Figura 2.4. Imágenes de la Tierra tomadas por la NASA con 34 años de diferencia.....	38
Figura 2.5. Árbol taxonómico mostrando los distintos géneros de Archaeas presentes en el rumen (Kim et al., 2011).....	41
Figura 2.6. Metabolismo de los ácidos nucleicos en rumiantes	45
Figura 2.7. Principales países productores de leche en la UE y sus producciones.	47
Figura 2.8. Evolución del precio de los cereales en el período 2000-2011.....	53
Figura 2.9. Fluctuaciones del precio del tomate redondo liso en el periodo 2010- 2012 (MARM, 2012).	55
Figura 2.10. Regiones hipervariables en el gen ARNr 16S.....	69
Figura 2.11. Esquema representativo de las reacciones que tienen lugar en un ciclo de PCR. .	71
Figura 2.12. Esquema de preparación de muestras y secuenciación en 454 GS FLX titanium.	75
Figura 3.1. Medida de la presión y del volumen de gas de fermentación en los frascos Wheaton.....	83
Figura 3.2. Gel de electroforesis	99
Figura 3.3. Fotografía gel en transiluminador.	99
Figura 3.4. Corte de bandas sobre pantalla con luz UV.....	99
Figura 3.5. Ejemplo de árbol filogenético construido a partir de secuencias de amplicones obtenidas con el 454 GS FLX titanium.....	1033
Figura 3.6. Proporciones de los distintos grupos taxonómicos en las muestras generados a partir del dendrograma.....	104
Figura 4.1. Diversidad de metanogénicas en el rumen de cabras canuladas en mantenimiento y en lactación alimentadas con las dietas experimentales; A: a nivel de phyla; B: a nivel de clase; C: a nivel de orden.....	116
Figura 4.2. Diversidad de metanogénicas en el rumen de cabras canuladas en mantenimiento y en lactación alimentadas con las dietas experimentales; A: a nivel de familia; B: a nivel de género.....	117
Figura 5.1. Composición en ácidos grasos (g/100 g de ácidos grasos identificados) de la leche de cabras alimentadas con las dietas experimentales.	197

LISTADO DE ABREVIATURAS¹

AA	<i>Aminoácidos / Amino acids</i>
AAE	<i>Aminoácidos esenciales</i>
AANE	<i>Aminoácidos no esenciales</i>
AC	<i>Dieta basada en heno de alfalfa y concentrado (exp. 2 y 3)</i>
ACT	<i>Dieta basada en heno de alfalfa, concentrado y bloque de tomate (exp. 2 y 3)</i>
ACC	<i>Dieta basada en heno de alfalfa, concentrado y bloque de pepino (exp. 2 y 3)</i>
ACB	<i>Dieta basada en heno de alfalfa, concentrado y bloque de cebada (exp. 2 y 3)</i>
ADF	<i>Acid detergent fiber</i>
ADL	<i>Acid detergent lignin</i>
ADN	<i>Ácido desoxirribonucleico</i>
AGVs	<i>Ácidos grasos volátiles</i>
AH	<i>Alfalfa hay</i>
ANOVA	<i>Analysis of variance</i>
AOAC	<i>Association of Official Analytical Chemists</i>
ARC	<i>Agricultural Research Council</i>
ARNr	<i>ARN ribosómico</i>
ATP	<i>Adenosin trifosfato</i>
B50	<i>Dieta basada en la dieta CO donde el 50% del concentrado ha sido reemplazado por bloque de cebada (exp. 1)</i>
B75	<i>Dieta basada en la dieta CO donde el 75% del concentrado ha sido reemplazado por bloque de cebada (exp. 1)</i>
B100	<i>Dieta basada en la dieta CO donde el 100% del concentrado ha sido reemplazado por bloque de cebada (exp. 1)</i>
BAL	<i>Bacterias asociadas a líquido</i>
BAS	<i>Bacterias asociadas a sólido</i>
BCMRM	<i>Batch cultures of mixed rumen microorganisms</i>
bp	<i>base pair</i>
BP	<i>Bases púricas</i>
BP:N	<i>Relación bases púricas:nitrógeno</i>
BT	<i>Bacterias totales</i>
BW	<i>Body weight</i>
BW^{0.75}	<i>Metabolic weight</i>
C50	<i>Dieta basada en la dieta CO donde el 50% del concentrado ha sido reemplazado por bloque de pepino (exp. 1)</i>
C75	<i>Dieta basada en la dieta CO donde el 75% del concentrado ha sido reemplazado por bloque de pepino (exp. 1)</i>
C100	<i>Dieta basada en la dieta CO donde el 100% del concentrado ha sido reemplazado por bloque de pepino (exp. 1)</i>
CH₄	<i>Metano</i>
CHO	<i>Carbohidratos / carbohydrates</i>
CLA	<i>Conjugated linoleic acid</i>
CN	<i>Casein</i>
CNRMR	<i>Cultivos no renovados de microorganismos ruminales</i>

¹Abreviaturas más destacadas del texto.

CO	<i>Dieta basada en heno de alfalfa y concentrado (exp. 1)</i>
CP	<i>Crude protein</i>
C_T	<i>Cycle threshold</i>
DGGE	<i>Denaturant Gradient Gel Electrophoresis</i>
DM	<i>Dry matter</i>
DMI	<i>Dry matter intake</i>
DNA	<i>Desoxirribonucleic acid</i>
DP	<i>Derivados púricos</i>
EAA	<i>Essential amino acids</i>
EB	<i>Energía bruta</i>
EE	<i>Extracto etéreo / ether extract</i>
EM	<i>Energía metabolizable</i>
EMNS	<i>Efficiency of microbial nitrogen synthesis</i>
ESNM	<i>Eficiencia de síntesis de nitrógeno microbiano</i>
FA	<i>Fatty acid</i>
FAD	<i>Fibra ácido detergente</i>
FAO	<i>Food and Agriculture Organization of United Nations</i>
FAOSTAT	<i>FAO statistical database</i>
FB	<i>Feed block</i>
FM	<i>Fresh matter</i>
FND	<i>Fibra neutro detergente</i>
FNM	<i>Flujo de nitrógeno microbiano</i>
GC-MS	<i>Gas chromatography-mass spectometry</i>
GE	<i>Gross energy</i>
GLM	<i>General linear model</i>
HA	<i>Heno de alfalfa</i>
HPLC	<i>High performance liquid chromatography</i>
INRA	<i>Institute National de la Recherche Agronomique</i>
LA	<i>Linoleic acid</i>
LAD	<i>Lignina ácido detergente</i>
LNA	<i>Linolenic acid</i>
ME	<i>Metabolizable energy</i>
MF	<i>Materia fresca</i>
MNF	<i>Microbial nitrogen flow</i>
MO	<i>Materia orgánica</i>
MS	<i>Materia seca</i>
MUFA	<i>Monounsaturated fatty acids</i>
N	<i>Nitrógeno</i>
NDF	<i>Neutral detergent fiber</i>
NEAA	<i>Non-essential amino acids</i>
N-NH₃	<i>Nitrógeno amoniacal</i>
NRC	<i>National Research Council</i>
NSC	<i>Non structural carbohydrates</i>
OA	<i>Oleic acid</i>
OM	<i>Organic matter</i>
OMAFR	<i>Organic matter apparently fermented in the rumen</i>
OTU	<i>Operational Taxonomic Unit</i>
P	<i>Probability</i>
PAC	<i>politica agraria común</i>
pb	<i>Pares de bases</i>

PB	<i>Purine bases</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction / reacción en cadena de la polimerasa</i>
PD	<i>Purine derivatives</i>
PUFA	<i>Polyunsaturated fatty acids</i>
PV	<i>Peso vivo</i>
PV^{0,75}	<i>Peso metabólico</i>
RDP	<i>Ribosomal Database Project (website)</i>
rss	<i>ribosomal small subunit (gene)</i>
RT-qPCR	<i>Real Time PCR / PCR en tiempo real o cuantitativa</i>
SA	<i>Stearic acid</i>
SEM	<i>Standard error of the mean</i>
SFA	<i>Saturated fatty acids</i>
SSU	<i>(Ribosomal) Small SubUnit</i>
T50	<i>Dieta basada en la dieta CO donde el 50% del concentrado ha sido reemplazado por bloque de tomate (exp. 1)</i>
T75	<i>Dieta basada en la dieta CO donde el 75% del concentrado ha sido reemplazado por bloque de tomate (exp. 1)</i>
T100	<i>Dieta basada en la dieta CO donde el 100% del concentrado ha sido reemplazado por bloque de tomate (exp. 1)</i>
TB	<i>Total bacteria</i>
TC50	<i>Dieta basada en la dieta CO donde el 50% del concentrado ha sido reemplazado por bloque de tomate y pepino (exp. 1)</i>
TC75	<i>Dieta basada en la dieta CO donde el 75% del concentrado ha sido reemplazado por bloque de tomate y pepino (exp. 1)</i>
TC100	<i>Dieta basada en la dieta CO donde el 100% del concentrado ha sido reemplazado por bloque de tomate y pepino (exp. 1)</i>
TS	<i>Total solids in milk</i>
VA	<i>Vaccenic acid</i>
VFA	<i>Volatile fatty acids</i>

Capítulo 1
Introducción y Objetivos

Capítulo 1

Más del 90% del ganado caprino se encuentra en países con bajos ingresos (países no desarrollados y en vías de desarrollo), especialmente en zonas desfavorecidas de Asia y África, y otros países de la Cuenca del Mediterráneo. El caprino representa una elevada proporción del total de rumiantes de producción en el mundo, situándose en tercer lugar tras el vacuno y el ovino. Aunque los sistemas de explotación de caprino españoles tienen en común un marcado carácter familiar, una deficiente tecnificación y gestión económica, se ha observado una tendencia hacia la intensificación y orientación lechera de sus explotaciones en los últimos años (Mena-Guerrero et al., 2005). La intensificación de los sistemas de producción de caprino en España ha incrementado el uso de concentrados para la alimentación de los animales, siendo ésta una práctica cada vez más extendida, tanto en sistemas intensivos como en semi-intensivos. En los sistemas andaluces también predomina el uso de concentrados aunque existan discrepancias en cuanto a los rendimientos productivos y económicos obtenidos (Mena-Guerrero et al., 2005, 2009). Por otro lado, el marco político y económico actual en el que se sitúa este sector pone de manifiesto la necesidad de establecer una serie de medidas para mejorar su competitividad (Mena-Guerrero et al., 2005; Escuder et al., 2006; Sánchez et al., 2008; Castel et al., 2010).

Los forrajes constituyen el alimento básico para rumiantes, pero diversas causas como una baja disponibilidad y/o calidad de los pastos, el aumento de las necesidades nutritivas de los animales en producción u otros factores mencionados anteriormente como la tendencia a la intensificación de los sistemas productivos determinan un incremento en el uso de concentrados en el área Mediterránea. Además, las cantidades de concentrado demandadas por los sistemas de producción son tan elevadas que superan la producción local de cereales para su elaboración. Los distintos gobiernos están realizando un gran esfuerzo para hacer frente a este problema mediante la importación de cereales y el estímulo al uso de otras materias primas durante épocas de sequía. Aunque, los cereales importados están subvencionados en algunos países los ganaderos siguen considerándolos caros, lo que limita su utilización en alimentación animal (Ben Salem et al., 2003). El incremento en el precio de los cereales (43% entre 2008 y 2011; FAO, 2011) ha hecho que los nutricionistas del sector dirijan su atención hacia la utilización de fuentes de nutrientes locales y no convencionales (Ben Salem, 2010; Molina-Alcaide et al., 2010), que ayuden a reducir los costes de producción. Además, existe un interés creciente por aquellas fuentes de alimentación no convencionales como los subproductos agroindustriales, no sólo porque pueden ayudar a reducir los costes de alimentación, sino porque también pueden ayudar a reducir la

Introducción y Objetivos

competencia existente entre hombres y animales por la utilización de cereales, ayudando a reducir los problemas medioambientales derivados de su acumulación (Vasta et al., 2008). Es también esencial tener en cuenta la salud del animal, así como la cantidad y calidad de los productos obtenidos cuando se incorporan a la dieta alimentos no convencionales (Vasta et al., 2008; Abbeddou et al., 2011a, b).

Los países del área Mediterránea producen una gran cantidad y variedad de productos agrícolas. Su procesado genera una gran cantidad de subproductos, que podrían utilizarse localmente como fuentes de nutrientes en las explotaciones ganaderas, tanto directamente como tras un procesado adecuado (Skouri, 1977). En las últimas décadas han adquirido relevancia los desechos y desechos procedentes del cultivo de frutas y hortalizas así como de las correspondientes industrias derivadas siendo importante evaluar su potencial en alimentación animal. El cultivo de frutas y hortalizas en invernaderos ha experimentado un enorme crecimiento en los últimos años, especialmente en España. De hecho, en el área Mediterránea, los cultivos de invernadero representan aproximadamente un 15% de la producción mundial, siendo España el principal productor. Este tipo de cultivo genera no sólo subproductos (hojas, ramas, plásticos, etc.), sino también desechos (frutos), que son almacenados en empresas de reciclado para tratar de reutilizarlos sometiendo a diversos procedimientos. Los más importantes son los desechos de tomate (350.000 Tm/año) y de pepino (60.500 Tm/año). Estos desechos podrían aportar nutrientes a los animales, especialmente carbohidratos y proteína con la ventaja de que están disponibles durante todo el año.

La utilización de materias primas no convencionales en alimentación animal tiene inconvenientes derivados de la posible variación en su composición y disponibilidad a lo largo del año, la presencia de contaminantes orgánicos e inorgánicos (Grasser et al., 1995; Mussatto et al., 2006) y un contenido en nutrientes de calidad media-baja. Debido al alto contenido en agua del tomate y el pepino, su inclusión en forma de bloques multinutrientes ayudaría a prevenir la pérdida de aquellos nutrientes presentes en su fracción acuosa, así como a su conservación (Ben Salem y Nefzaoui, 2003). Aunque, la inclusión de subproductos del tomate en alimentación de rumiantes ha sido estudiada por diversos autores (Fondevila et al., 1994; Ojeda y Torrealba, 2001; Denek y Can, 2006; Ben Salem y Znaidi, 2008; Abbeddou et al., 2011a), no se ha encontrado información referida al uso de frutos de tomate ni de pepino.

Capítulo 1

Un aspecto al que se confiere una extraordinaria importancia en la actualidad es el relativo a la presencia de compuestos secundarios de distinta índole en subproductos y desechos vegetales, que pueden representar un valor añadido, como han sugerido diversos autores (Newbold et al., 2004; Guo et al., 2008; Powell et al., 2009; Wang et al., 2009; Woodward et al., 2009; Ben Salem y Makkar, 2010; Patra y Saxena 2010; Greenwood et al., 2012). Esos compuestos se consideran bioactivos, con efectos como la reducción de la producción de metano y del nitrógeno en orina, aspectos de gran interés medioambiental (Di y Cameron, 2007).

En la actualidad existe un creciente interés por el desarrollo de estrategias alimentarias que ayuden a reducir las emisiones de metano procedente de la fermentación entérica de los rumiantes (Tavendale et al., 2005; Ellis et al., 2007; Sauvant y Giger-Reverdin, 2007; Martín et al., 2010; Abecia et al., 2012). El metano es un “gas de efecto invernadero” que absorbe la radiación infrarroja procedente del sol, quedando esta atrapada en la atmósfera de la Tierra, dando lugar al incremento de su temperatura y fomentando el calentamiento global (Janssen y Kirs, 2008). El efecto invernadero del metano es 25 veces más potente que el del CO₂ (Forster et al., 2007), siendo además el segundo “gas de efecto invernadero” en volumen por detrás del CO₂ (Hook et al., 2010; Wright y Klieve, 2011). La producción de rumiantes juega un importante papel en el cambio climático (Steinfeld et al., 2006; Hook et al., 2010; Martín et al., 2010; Martínez-Sibaja et al., 2010), siendo responsable del 45% de las emisiones de metano de origen antrópico (NRC, 2003; Ellis et al., 2007). Además, su síntesis, que tiene lugar en el rumen, representa una pérdida significativa de energía para el animal (2 al 12% de la energía bruta ingerida; Johnson y Johnson, 1995; McAllister et al., 1996; Moss et al., 2000). Si las emisiones de metano continúan creciendo en la misma proporción que lo han hecho en las últimas décadas, es previsible un incremento del 60% para el año 2030 (FAO 2003). Sin embargo, a través de la manipulación de la dieta de los rumiantes se podría modificar el actual escenario en cuanto a las emisiones de metano y paliar parte de este incremento.

La leche constituye para las personas una fuente importante de energía, proteína de buena calidad, vitaminas y minerales (Park et al., 2007). La leche de cabra se considera cada vez más como un alimento funcional, que ayuda al consumidor a preservar su salud. La inclusión de subproductos agroindustriales en la dieta del rumiante puede modificar el perfil en ácidos grasos de la leche en función del nivel en que se incluyan en la dieta, de su composición y de la calidad de los nutrientes que contengan (Leiber et al., 2005; Vasta et al., 2008; Molina-Alcaide et al., 2010). El papel de la grasa de la leche en la salud del consumidor es uno de los principales objetos de estudio en los últimos años (Elwood et al., 2008; Lock et al., 2008),

sobre todo por su asociación con enfermedades cardiovasculares. Por ello, un número importante de investigaciones se centra en el estudio del efecto de determinados aditivos alimentarios o ingredientes de la dieta que contribuyan a reducir la formación de ácidos grasos saturados e incrementen la de ácidos grasos poliinsaturados en los productos derivados de los rumiantes. Son escasos los estudios acerca de los efectos de la inclusión de subproductos y desechos agroindustriales en la dieta de rumiantes sobre la calidad de la leche producida (Tsiplakou y Zervas, 2008; Molina-Alcaide et al., 2010; Romano et al., 2010; Abbeddou et al., 2011; Modaresi et al., 2011), pero ninguno ha evaluado los posibles efectos sobre las emisiones de metano.

La evaluación de fuentes de nutrientes alternativas para incluir en la dieta de rumiantes requiere conocer previamente su efecto sobre la fermentación ruminal. Aunque, los estudios *in vivo* son finalmente necesarios, los sistemas de simulación *in vitro* de la fermentación ruminal son recomendables para evaluar tanto los posibles efectos tóxicos como la calidad de la fermentación promovida por dietas que incluyan subproductos o desechos. Además, los sistemas *in vitro* permiten evaluar un gran número de muestras en un mismo experimento (Kajikawa et al., 2003).

Por todo lo expuesto anteriormente, el trabajo recogido en esta Memoria de Tesis Doctoral se propone con los siguientes objetivos:

1. Estudiar la posibilidad de incluir desechos de frutos de tomate y pepino, producidos en invernaderos y con elevadas cantidades de agua, en dietas prácticas de caprino en mantenimiento y lactación, mediante la elaboración de bloques multinutrientes
2. Establecer el nivel óptimo de sustitución del concentrado en la dieta de caprino en mantenimiento y lactación por los bloques multinutrientes
3. Comparar bloques multinutrientes que incluyen destríos de tomate o pepino con bloques que incluyan cebada grano
4. Estudiar el efecto de la sustitución parcial de concentrado por bloques multinutrientes, que incluyen destríos de tomate y pepino o cebada grano, sobre la ingesta, el peso de los animales, la utilización digestiva y metabólica de los nutrientes y de la energía, la fermentación ruminal, la producción de metano y proteína microbiana, las abundancias de bacterias totales y de arqueas metanogénicas y la diversidad de estas, tanto en cabras en mantenimiento como en lactación, así como sobre la producción y composición de la leche en estas últimas.

Capítulo 1

1.1. INTRODUCTION AND OBJECTIVES

More than 90% of goat breeds are located in countries with low incomes (undeveloped and developing countries), especially in disadvantaged areas from Asia and Africa, and countries from the Mediterranean Basin. The goat sector is highly represented around the world, being the third in proportion after cattle and sheep. Although, in Spain goat production systems are family business, poor qualified and managed, a tendency towards intensification and milk production has been observed during the last decade (Mena-Guerrero et al., 2005). In Spain the demand of concentrates has increased either for intensive or semi-intensive systems ruminant production systems. In Andalusia, the utilization of concentrates in goat's production systems is also widespread, although the productive and economic profit generated should be taken into account (Mena-Guerrero et al., 2005, 2009). On the other hand, the actual politic and economic frame surrounding the small ruminant sector, is pushing harder to the development of different strategies to improve their competitiveness in the european market (Mena-Guerrero et al., 2005; Escuder et al., 2006; Sanchez et al., 2008; Castel et al., 2010).

Forage is the staple food for ruminants, but the low availability and/or quality of pastures, increased energy and nutrient requirements of productive animals and other factors previously mentioned as the trend towards intensification of the animal production systems, determined an increase of concentrates utilization in the Mediterranean area. Moreover, amounts of concentrate needed for animal feeding are so high that the stock of locally produced feed grain may not satisfy this demand. Efforts are continuously made by governments to tackle this problem through import of feed grain and other concentrate feed, particularly in dry years. Although prices of cereals are subsidized in numerous countries, farmers still consider them as expensive, which is limiting animal productivity (Ben Salem et al., 2003). Increased cereal prices (43% from 2008 to 2011; FAO, 2011) have driven the attention of ruminant nutritionists toward local alternative feedstuffs (Ben Salem, 2010; Molina-Alcaide et al., 2010) in order to reduce production cost. In addition, non-conventional local materials like by-products from agriculture may be of interest to reduce both competition between human and animal nutrition for cereals and environmental problems associated with by-products accumulation (Vasta et al., 2008). Preservation of animal health, products yield

and quality must be taken into account when using by-products in animal feeding as well (Vasta et al., 2008; Abbeddou et al., 2011a, b).

Mediterranean countries produce a fairly wide and diversified range of agricultural products. Their processing produces a large quantity of by-products locally suitable for use as animal feeds, either directly or after appropriate treatments (Skouri, 1977). During the last decades, unconventional feedstuffs have become available, such as vegetable- and fruit-processing residues, which the nutritive quality should be evaluated in animals. During the last years, the culture of vegetables under greenhouses is growing exponentially, especially in Spain. Therefore, in the Mediterranean area, greenhouse horticulture represents about 15% of the world production, Spain being the main producer. This type of culture generates not only by-products (leaves, branches, plastics, etc.) but also wastes, mainly fruits that are being stored in recycling-enterprises who look for a diversity of ways to recycle these wastes and by-products. This intensive horticulture generates huge amounts of wastes, mainly from tomato and cucumber fruits (about 350,000 and 60,500 Tm/year, respectively) which may provide nutrients for animals, especially carbohydrates and protein, being available during whole year.

The utilization of by-products in animal feeding may have been associated with variations on their chemical composition and availability along the year, and with the presence of organic and inorganic contaminants as well (Grasser et al., 1995; Mussatto et al., 2006) and a low-medium nutritive value. As tomato and cucumber have high moisture content, their inclusion in feed blocks would prevent the loss of the nutrients that remain soluble, and allow their long term conservation (Ben Salem and Nefzaoui, 2003). To our knowledge, the use of tomato by-products for ruminant feeding has been explored (Fondevila et al., 1994; Ojeda and Torrealba, 2001; Denek and Can, 2006; Ben Salem and Znaidi, 2008; Abbeddou et al., 2011a) but no information is available regarding the inclusion of tomato and cucumber fruits in ruminant diets.

Recently, some authors (Newbold et al., 2004; Guo et al., 2008; Powell et al., 2009; Wang et al., 2009; Woodward et al., 2009; Ben Salem y Makkar, 2010; Patra y Saxena 2010; Greenwood et al., 2012) suggest that the utilization of by-products in animal feeding could be associated with reductions in methane emissions and urine nitrogen excretion, derived from the presence of plant secondary compounds, which is of worldwide environmental concern (Di y Cameron, 2007)

Capítulo 1

Nowadays there is an increased interest on the development of dietary strategies that could reduce methane emissions from ruminant enteric fermentation (Tavendale et al., 2005; Ellis et al., 2007; Sauvant y Giger-Reverdin, 2007; Martín et al., 2010; Abecia et al., 2012). Methane is known as a "greenhouse gas" that absorbs infrared radiation from the sun, trapping it in the Earth's atmosphere and leading to increased temperatures responsible of global warming and greenhouse effect (Janssen y Kirs, 2008). Methane greenhouse effect is 25 higher than that of CO₂ (Forster et al., 2007), being also the second "greenhouse gas" in volume after CO₂ (Hook et al., 2010; Wright y Klieve, 2011). Thus, ruminant production systems play an important role on climate change (Steinfeld et al., 2006; Hook et al., 2010; Martín et al., 2010; Martinez-Sibaja et al., 2010), accounting for 45% of the antropogenic methane emissions (Ellis et al., 2007; NRC, 2003). Moreover, its synthesis, which takes place in the rumen, represents a significant energy loss for the animal (2 to 12% of gross energy intake; Johnson and Johnson, 1995; McAllister et al., 1996; Moss et al., 2000). If methane emissions continue to rise in direct proportion to livestock number a 60% increase in global methane production is predicted by 2030 (FAO 2003). However, changes in feeding management could remodel the present scenario of methane emission from livestock and thus mitigate that increase.

Milk is widely recognized as a valuable natural source of energy, high quality protein, vitamins and minerals (Park et al., 2007). Nowadays, milk from goats is demanded as a functional food, which may prevent consumer health. The inclusion of agroindustrial by-products in ruminant's diet could modify milk fatty acid profile, which may rely upon the level of inclusion, chemical composition, and nutritive value (Leiber et al., 2005; Vasta et al., 2008). During the last years many studies have evaluated the role of milk fat in the health of consumers (Elwood et al., 2008; Lock et al., 2008). Research has been focused on feed additives or diet ingredients that could reduce the formation of saturated FA and increase the concentration of unsaturated FA in ruminant products. As far as we know, few studies has been conducted regarding changes in milk FA composition in small ruminants when feeding agroindustrial by-products (Tsiplakou and Zervas, 2008; Molina-Alcaide et al., 2010; Romano et al., 2010; Abbeddou et al., 2011; Modaresi et al., 2011) but no information exists concerning their effects on methane emissions by ruminants.

Introducción y Objetivos

The evaluation of the potential use of alternative feedstuffs in ruminant feeding requires the previous statement of their effects on ruminal fermentation. Although *in vivo* studies are ultimately needed, the *in vitro* techniques for ruminal fermentation simulation may be used to test whether there is any toxic effect and the fermentation pattern promoted with different diets. In addition, these methodologies allow for evaluating high number of samples on a single experiment (Kajikawa et al., 2003).

Taken into account previous considerations, the objectives of this work were the following:

1. To evaluate the practical conditions to include by-products with high moisture content, such as tomato and cucumber waste fruits from greenhouse horticulture, in non-productive and productive goats diets by using feed blocks technology.
2. To determine the appropriate concentrate replacement level with feed blocks in non-productive and dairy goat diets.
3. To compare feed blocks containing tomato and cucumber waste fruits with those including barley.
4. To study the effect of the partial replacement of concentrate with feed blocks containing tomato and cucumber waste fruits or barley, on feed intake, body weight, nutrient and energy utilization and metabolism, ruminal fermentation, methane emissions, microbial protein synthesis, microbial abundances and diversity of bacteria and methanogens, in non-productive and productive dairy goats in which milk yield and composition were also evaluated.

Capítulo 2
Revisión Bibliográfica

2.1. EL ANIMAL RUMIANTE

2.1.1. Importancia ecológica

Vertebrados e invertebrados carecen de las enzimas necesarias para la degradación de la fibra, presentes exclusivamente en ciertos microorganismos. A lo largo de su historia evolutiva, los animales herbívoros y ciertos microorganismos han desarrollado y perfeccionado una relación simbiótica mutualista, en la cual los microorganismos aportan su potencial degradador de compuestos como la celulosa, hemicelulosa y lignina, parte de los cuales son recalcitrantes para los sistemas enzimáticos del tracto digestivo animal. Las plantas presentan un importante reservorio de hidratos de carbono en forma de polisacáridos estructurales. La celulosa, componente de la pared celular vegetal, es el carbohidrato más importante de la misma y constituye la mayor parte de la biomasa terrestre.

El tracto digestivo de herbívoros, rumiantes y no rumiantes, presenta determinadas regiones (rumen, colon, ciego), que albergan una importante microbiota. En función de la localización de la microbiota en el tracto digestivo, los animales herbívoros pueden clasificarse en fermentadores pregástricos o rumiantes (cabras, ovejas, vacas, etc.) y fermentadores postgástricos (caballos, conejos, etc.). La fermentación pregástrica posibilita una utilización más eficiente de los forrajes que la postgástrica, ya que la primera implica que el material vegetal se degrada antes de llegar al intestino delgado, donde tiene lugar la absorción de la mayoría de los nutrientes (Moir, 1965). Los rumiantes han desarrollado un modo de digestión que les ha permitido adaptarse al ambiente, gracias a la relación simbiótica establecida con los microorganismos que albergan en el rumen. La domesticación de este tipo de animales, se ha mantenido principalmente por su eficiente utilización de la celulosa, y su escasa competencia con los humanos por los alimentos, además de otros aspectos productivos. Asimismo, las adaptaciones anatómicas de estos animales les han permitido utilizar nutrientes no digeribles para otros animales y prescindir de fuentes externas de vitaminas del grupo B, y tener capacidad para utilizar nitrógeno no proteico en su dieta. Su amplia adaptabilidad al medio natural, consecuencia de su capacidad para aprovechar alimentos de baja calidad, ha posibilitado una radiación adaptativa mayor que la de herbívoros fermentadores postgástricos y la cría de estos animales incluso en los ambientes más extremos.

Capítulo 2



Figura 2.1. Animales domésticos y de granja en el Antiguo Egipto.

Los primeros rumiantes aparecieron en la Tierra hace unos 50 millones de años. A lo largo de este periodo de tiempo, aquellos primeros organismos de no más de 5 kg de peso, moradores de los bosques y omnívoros, han evolucionado y se han diversificado considerablemente y, en la actualidad, existen unas 200 especies de rumiantes, tanto domésticos como salvajes, de las que sólo 6 se han domesticado y han experimentado modificaciones genéticas y fenotípicas como consecuencia de su relación con los humanos. Los orígenes de la *Capra hircus* o cabra doméstica son inciertos, pero la existencia de restos arqueológicos sugiere que fue domesticada hace 10.000 años (van Soest, 1994). Probablemente fue el primer rumiante domesticado (Boyazoglu et al., 2005), ya que la cabra silvestre estaba presente en las regiones del Sur de Asia Occidental donde la agricultura estaba muy desarrollada (**Figura 2.1**). Las manadas de cabras silvestres (*Capra aegagrus*) y de *Nubian ibex* (*Capra ibex*) fueron el recurso fundamental para esas poblaciones, como demuestran los restos arqueológicos. Aunque es difícil distinguir los restos de una y otra especie, es evidente por la localización y la edad de los mismos, que la única especie que se domesticó fue la *Capra aegagrus*. La evidencia más temprana de fósiles, fechados hace 9.000 años, de cabras domésticas se encontró en el sudoeste de Irán y en la meseta Iraní donde se encontraron fósiles fechados hace 10.000 años. El origen de la cabra doméstica en Europa parece situarse en Asia Occidental, dado que, con excepción de Creta y otras islas griegas, sólo se han encontrado cabras *Nubian ibex*. La cabra doméstica tiene una gran resistencia a

ambientes muy hostiles, debido a su capacidad para recorrer largas distancias, seleccionar los alimentos más nutritivos y utilizar eficientemente aquellos con bajo contenido en nutrientes (Morand-Fehr et al., 2004).

2.1.2. Fermentación microbiana en el rumen

2.1.2.1. Anatomía y compartimentación en el rumen

El estómago de los rumiantes está constituido por tres preestómagos (rumen, retículo y omaso) y un estómago glandular (abomaso). Tienen, entre los cuatro, una capacidad aproximada de 7,5 a 8 litros en un pequeño rumiante, de los cuales el 80% corresponde al rumen y un 5 % al retículo, de modo que el conjunto rumen-retículo contiene aproximadamente 6 litros. Fisiológicamente funciona como una unidad en la que se produce la fermentación microbiana del alimento. Este compartimento está constituido, a su vez, por varias cavidades o sacos separados mediante pilares musculares. La anatomía del rumen tiene una importancia crucial en la degradación de la fibra. Por un lado, las contracciones de las paredes del rumen posibilitan la mezcla de la digesta con la microbiota, lo cual, unido a la disminución del tamaño del alimento por su trituración, potencia la acción fermentativa de los microorganismos. Por otro lado, el orificio retículo-omasal permite retener el alimento en el rumen durante un largo periodo de tiempo, asegurando la acción de las enzimas microbianas sobre la fibra (Mackie et al., 1997). La función del omaso es deshidratar la ingesta que le llega del rumen-retículo. El rumen ocupa el hemi-abdomen izquierdo y, se expande, ventralmente por el lado derecho; se extiende, por lo tanto, desde el diafragma hasta la entrada de la pelvis y desde el techo hasta el suelo del abdomen. El retículo, de menor tamaño, se sitúa craneoventralmente al rumen, entre éste y el diafragma, apoyado en la apófisis xifoides del esternón; se extiende desde la 6ª a la 9ª costillas, ventralmente y por el lado izquierdo. Por otro lado, el contenido del rumen-retículo presenta cierto grado de estratificación, así en orden descendente se distinguen tres estratos en el interior del rumen: *i*) gaseoso, *ii*) sólido grosero o alimento recién ingerido, *iii*) sólido fino o alimento regurgitado y remasticado, y *iv*) líquido. Los alimentos recién ingeridos se apilan sobre el material sólido previamente regurgitado y remasticado, quedando en una disposición adecuada para ser regurgitado y remasticado con posterioridad.

Diversos estudios, realizados entre los años 60 y 80, pusieron de manifiesto que la microbiota ruminal aparece en el animal joven en una secuencia bien definida (Fonty et

Capítulo 2

al., 1987). Los microorganismos ruminales ocupan progresivamente el rumen y van distribuyéndose de una forma heterogénea en su interior, pudiéndose encontrar asociados a la fases sólida y líquida e, incluso, a la pared ruminal. Cada uno de esos compartimentos aloja diferentes consorcios microbianos, con un papel específico en la degradación del alimento (Kong et al., 2010). La idea del rumen como un sistema complejo, con diferentes poblaciones microbianas asociadas a fases distintas, se gestó a medida que se profundizaba en el conocimiento de la degradación de sustratos en esta parte del digestivo de rumiantes, mediante el empleo de diferentes marcadores, solubles o asociados a las partículas de la digesta. Así, Cheng y Costerton, en 1980, subdividieron la comunidad microbiana en 3 tipos: microorganismos asociados a la pared ruminal, libres en el líquido ruminal y adheridos a las partículas de la digesta. Posteriormente, Czerkawski (1986) consideró dos grupos diferentes de microorganismos asociados a la fase sólida de la digesta: los asociados firmemente y los asociados de una forma más laxa.

Los microorganismos asociados a la *fracción líquida* del contenido ruminal han sido los más estudiados, debido a su mayor accesibilidad, aunque tan sólo representan el 10% de la microbiota ruminal. Su importancia reside en su papel como “compartimento de paso” y de transporte, tanto de solutos como de microorganismos. En la fracción líquida existen microorganismos propios y otros en tránsito, procedentes de la pared ruminal o de la fracción sólida de la digesta. La *fracción sólida* de la digesta ruminal contiene la mayor parte (70 - 80%) de los microorganismos ruminales (Forsberg y Lam, 1977; Craig et al., 1987; Minato et al., 1993), fundamentalmente especies fibrolíticas. Los *microorganismos firmemente adheridos* a partículas son los de mayor densidad y diversidad (Larue et al., 2005; Kong et al., 2010) e incluye a las principales especies degradadoras del alimento, que pueden encontrarse adheridas a las partículas o en cavidades de las mismas (McAllister et al., 1994). Las *especies laxamente adheridas* a partículas pueden desligarse de las mismas con relativa facilidad por las contracciones ruminales, el flujo de la fracción líquida e, incluso, por la rumia (Czerkawski, 1986). El compartimento ruminal que alberga a las especies laxamente adheridas presenta una alta tasa de transferencia de nutrientes y una elevada actividad metabólica (Cheng y McAllister, 1997).

La composición química de las bacterias asociadas a la fracción sólida (BAS) y de las asociadas a la fracción líquida (BAL) es diferente (Merry y McAllan, 1983; Craig et

al., 1984; Molina-Alcaide et al., 2009), así como también lo son sus funciones metabólicas (Latham, 1980; Williams y Strachan, 1984) y su composición en especies (Minato et al., 1966; Larue et al., 2005; Abecia et al., 2012). Con respecto a la composición bacteriana, la fracción BAS presenta una abundancia de especies de *Firmicutes* ligeramente mayor y menor cantidad de *Bacteroidetes* que la fracción BAL (Flint et al., 2008). La composición química y microbiana de ambas fracciones se puede alterar en respuesta a diversos factores nutricionales como el tipo de dieta, el tipo de forraje o su proporción en la dieta, la presencia de aditivos, el grosor del alimento, etc. (Molina-Alcaide et al., 1996, 2009; Yang et al., 2001a; Larue et al., 2005).

El *epitelio ruminal* está muy irrigado y oxigenado y presenta una microbiota anaerobia facultativa (Cheng y McAllister, 1997). Muchos de estos microorganismos tienen actividad ureasa, que permite el reciclado de la urea plasmática (Cheng y Wallace, 1979) y, una alta actividad proteolítica. Los microorganismos asociados a la pared del retículo-rumen, tanto protozoos como bacterias anaerobias facultativas, desempeñan una importante función protectora al minimizar la entrada de oxígeno al rumen por difusión. Abe et al. (1981) observaron que los protozoos *Holotrichos* podían retenerse durante unas horas tras la ingesta de alimento en las paredes del retículo-rumen, lo que Williams (1986) relacionó con su capacidad de metabolizar oxígeno, actividad que les suministraría un aporte extra de ATP. El secuestro del oxígeno y el aporte de hidrógeno, por parte de los protozoos *Holotrichos*, tendrían un efecto protector y beneficioso sobre las poblaciones de arqueas metanogénicas (Hillman et al., 1988, 1989).

2.1.2.2. Degradación de nutrientes en el rumen

La verdadera importancia de la fermentación ruminal radica en que permite al rumiante aprovechar alimentos que no pueden ser digeridos por sus propias enzimas gástricas, tales como los hidratos de carbono estructurales o los compuestos nitrogenados no proteicos (Van Soest, 1982). Dado que la fermentación ruminal es un proceso anaerobio, la oxidación de los substratos no es completa y la eficiencia energética del proceso se considera baja (Ørskov y Ryle, 1990). El rumen es una cámara de fermentación que alberga una población microbiana (bacterias, arqueas, protozoos y hongos), que se mantiene gracias a un entorno favorable (temperatura, anaerobiosis, pH, potencial redox) y a unas características anatómo-fisiológicas que permiten un aporte y

Capítulo 2

evacuación continua de nutrientes y de los productos de la fermentación, respectivamente. Los microorganismos ruminales obtienen la mayor parte de la energía que requieren a partir de la fermentación de carbohidratos, puesto que la que pueden obtener de la proteína es reducida y entre las grasas, sólo fermenta el glicerol (Hvelplund y Madsen, 1985). Por ello, la disponibilidad de energía fermentable es el principal factor limitante del crecimiento microbiano en el rumen (Buttery y Lewis, 1982). Así pues, el proceso de fermentación transforma los substratos, principalmente hidratos de carbono y proteínas, en ácidos grasos volátiles (AGVs), ácido láctico, masa microbiana, aminoácidos, péptidos, CO₂, CH₄, y NH₃ (Van Soest, 1982; Ørskov y Ryle, 1990) (**Figura. 2.2**). Los AGVs constituyen la principal fuente de energía del rumiante, siendo absorbidos a través de la mucosa ruminal y posteriormente aprovechados en sus distintos tejidos (Weston y Hogan, 1968). Además, la distensión en las paredes del rumen, causada por la acumulación del CO₂ y CH₄ producidos, estimula el reflejo del eructo, que permite la expulsión de esos gases a través de la nariz y la boca (Chesson y Forsberg, 1997; Hook et al., 2010). Los aminoácidos y péptidos del alimento que recibe el animal pueden ser utilizados directamente por los microorganismos ruminales, cuando existe energía para incorporarlos a la proteína microbiana que se sintetiza, previa o no la transaminación; también pueden desaminarse con fines energéticos formándose amoníaco y esqueletos carbonados (Maeng y Baldwin, 1976) si la energía es limitante. El resto de los productos de la fermentación y parte de la masa microbiana, pasan al abomaso y al intestino delgado, donde se digieren antes de ser absorbidos. Los microorganismos que llegan al abomaso, fundamentalmente bacterias y protozoos, constituyen la principal fuente de proteína para el animal. De hecho, más de un 70% de los aminoácidos duodenales, dependiendo del tipo de dieta, tienen un origen microbiano (van Soest, 1994). No obstante, la proporción de proteína microbiana en el quimo varía entre 33% (Coomer et al., 1993) y 92% (Ben-Ghedalia et al., 1978) siendo los aspectos fisiológicos, aunque también los metodológicos, los principales responsables de la variabilidad observada (Broderick y Merchen, 1992). Como resultado de la fermentación de los carbohidratos, el pH ruminal puede descender considerablemente, impidiendo la actividad de diversas especies de microorganismos, especialmente de aquellos que presentan actividad fibrolítica. Para evitar esto, el sistema se tampona eficazmente mediante las sales presentes en la saliva y el bicarbonato disuelto en el líquido ruminal (Counotte et al., 1979).

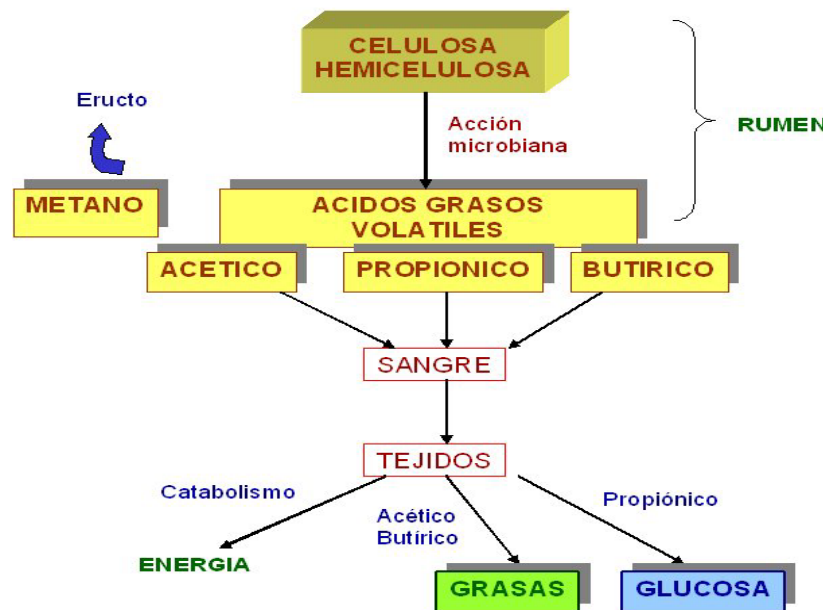


Figura. 2.2. Digestión y absorción de carbohidratos en rumiantes

2.1.2.3. Microbiota ruminal

La colonización del rumen del animal neonato por los microorganismos se inicia en el momento del nacimiento, cuando el animal pasa a través del canal del parto. La colonización continúa tras el nacimiento por el contacto directo del animal joven con los adultos o los pastos, comederos, abrevaderos, etc. contaminados con saliva y heces de los adultos (Dehority, 2003). La composición y evolución de la microbiota ruminal de un animal están determinadas por factores diversos tales como la edad, localización geográfica, interacción hospedador-microorganismos, dieta, frecuencia con que el animal se alimenta, etc. (Dehority y Orpin, 1997). Los microorganismos ruminales establecen entre sí relaciones complejas, que permiten la degradación del alimento que llega al rumen y, en consecuencia, la utilización de los nutrientes que contiene (Mackie, 1997). Aparte de estas relaciones de cooperación, y al igual que en cualquier otro ecosistema, también en el rumen se establecen relaciones de competencia intra e inter-específica y de predación (Ley et al., 2006).

La microbiota del rumen desarrolla una serie de estrategias que le permiten la colonización, supervivencia y crecimiento en el ambiente ruminal: *i*) disponen de moléculas que posibilitan la adhesión, colonización y degradación de los sustratos, la inhibición del crecimiento de competidores (bacteriocinas) o sobrevivir a la barrera del sistema inmune del animal hospedador; *ii*) plasticidad genética para adaptarse a los cambios que puedan

Capítulo 2

producirse en el rumen y; *iii*) tasas elevadas de proliferación, que permiten el mantenimiento de poblaciones microbianas estables (Ley et al., 2006). El conocimiento de los microorganismos ruminales resulta difícil ya que se trata de una microbiota muy compleja consistente en especies que residen de forma estable con otras que se incorporan del medio externo o de la cavidad bucal del animal, y que sólo permanecen temporalmente en el rumen. La mayor parte de los microorganismos que componen la microbiota ruminal son bacterias, esencialmente anaerobias estrictas pero también anaerobias facultativas y aerobias (Hungate, 1966). Algunas toleran bajas concentraciones de oxígeno; sin embargo, el oxígeno que entra a través del alimento, del agua de bebida o de las paredes del rumen es rápidamente metabolizado, utilizándose como donador de electrones en la fermentación. El potencial redox se mantiene así entre -250 y -450 mV (Van Soest, 1982). Otros componentes de la microbiota ruminal son protozoos ciliados y flagelados, arqueas, hongos y virus (**Figura. 2.3**). Las estimaciones del número de especies microbianas ruminales muestran resultados muy heterogéneos, que dependen en gran medida del método que se emplee para cuantificarlas (Edwards et al., 2004; Sundset et al., 2007; Kim et al., 2010, 2011). Se estima que en el rumen hay más de 1.000 especies distintas de bacterias, protozoos y hongos (Deng et al., 2008), que filogenéticamente pertenecen a los 3 dominios de la vida (Woese et al., 1990), esto es Bacteria, Archaea y Eucarya. Además, la diversidad y proporciones de la microbiota ruminal pueden verse afectadas por factores tales como el animal y la especie a la que pertenece (Swain et al., 1996; Lin et al., 1997; Weimer et al., 1999; Galbraith et al., 2004; Regensbogenova et al., 2004; Ley et al., 2008; Shi et al., 2008; Ramos et al., 2009; Belenguer et al., 2010; Zhou et al., 2010), diferencias geográficas (Ramšak et al., 2000; Wright et al., 2007), la fracción o compartimento ruminal considerados (Tajima et al., 1999), variaciones circadianas (Weimer et al., 1999; Fields et al., 2000; Koike et al., 2007) o la dieta suministrada al animal (Dehority y Orpin, 1997; Tajima et al., 2000; Kocherginskaya et al., 2001; Larue et al., 2005; Sun et al., 2010).



Figura 2.3. Bacterias, protozoos, hongos y virus del rumen.

Mediante técnicas de cultivo se estimó la existencia de unas 200 especies de organismos procariotas en el rumen, 20 – 30 de las cuales serían predominantes (Bryant, 1959; Stewart et al., 1997). Estas estimaciones, no obstante, están muy lejos de representar toda la diversidad real, ya que las especies cultivables representarían tan solo un 10 - 15% del total (Hespell et al., 1997; Edwards et al., 2004). Estimaciones más recientes, basadas en el análisis del ADN ribosómico 16S, indican la existencia en el rumen de 300 a 400 especies bacterianas (Edwards et al., 2004; Yu et al., 2006). Otros autores, basándose en cálculos matemáticos, consideran que en el rumen existen hasta 16.000 taxones diferentes (Curtis et al., 2002; Edwards et al., 2004), considerando diferencias inferiores al 95% en la secuencia del gen ARNr 16S.

Bacterias y **arqueas** constituyen el 50 – 60% de la masa microbiana del rumen (Stewart et al., 1997). El número de las mismas es de 10^{10} - 10^{11} y 10^7 – 10^9 células/ml del contenido ruminal, respectivamente (Hungate, 1966; Stewart et al., 1997). Las bacterias se encuentran distribuidas en 19 phylae de los cuales *Firmicutes*, *Bacteroidetes* y *Proteobacteria* son los más abundantes (57,8, 26,7 y 6,9%, respectivamente; Kim et al., 2011). Las bacterias están implicadas en múltiples actividades metabólicas (degradación de carbohidratos simples y complejos, lípidos, proteínas, etc.). En cuanto a los microorganismos pertenecientes al dominio *Archaeobacteria* (arqueas), la gran mayoría pertenecen al phylum *Euryarchaeota*, constituido por las clases *Methanobacteria*, *Methanomicrobia*, *Thermoplasmata* y *Methanopyri* (70,3, 16,4, 7,4 y 0,03%, respectivamente; Kim et al. 2011). Estas son las únicas arqueas conocidas del rumen y son responsables de la producción de metano. No obstante, ciertos autores contemplan la posibilidad de que existan otras arqueas no cultivadas con una función diferente a las metanogénicas (Tajima et al., 2001). Como se ha mencionado anteriormente, numerosos estudios han demostrado las relaciones simbióticas de las arqueas metanogénicas con otros microorganismos del rumen, especialmente con los protozoos a los que se pueden asociar tanto intra como extracelularmente (Sharp et al., 1998). *Archaeas* pertenecientes a los órdenes *Methanobacteriales* y *Methanomicrobiales* se han encontrado asociadas con protozoos de los géneros *Entodinium*, *Polyplastron*, *Epidinium*, y *Ophryoscolex* (Sharp et al., 1998). También se han observado interacciones de diversas especies de metanogénicas con hongos anaeróbicos, como *Neocallimastix frontalis* (Bauchop y Mountfort, 1981; Mountfort et al., 1982; Joblin et al., 2002).

Capítulo 2

La concentración de **protozoos** en el rumen de un animal adulto sano es de 10^4 - 10^6 células/ml (Wright y Klieve, 2011), pudiendo representar hasta el 50% de la masa microbiana. Se clasifican en dos grandes grupos, en función de su morfología: *i*) flagelados y *ii*) ciliados, siendo estos últimos los más numerosos e importantes (*Holotricos* y *Entodiniomorfos*; Williams y Coleman, 1997). El uso de técnicas moleculares ha permitido profundizar en el conocimiento de las relaciones filogenéticas de los distintos tipos de protozoos, su abundancia y distribución en el rumen (Wright et al., 1997; Wright, 1999; Karnati et al., 2003; Shin et al., 2004). Su papel en el rumen no está claro pero se conoce que los protozoos ciliados se asocian a las arqueas metanogénicas, que podrían suponer hasta un 20% del total arqueas en el rumen (Mackie et al., 2002). Algunos autores no han encontrado grandes modificaciones del metabolismo ruminal en ausencia de protozoos (Ushida et al., 1991), mientras que otros han observado cambios importantes: *i*) disminución significativa de la digestibilidad de la materia orgánica (Eugène et al., 2004a, b), *ii*) aumento en la concentración de amonio y el flujo de proteína bacteriana hacia el duodeno en animales libres de protozoos (Koenig et al., 2000), *iii*) disminución del pH ruminal (Wakita y Hoshino, 1989), *iv*) contribución importante al flujo de ácidos grasos poliinsaturados y proteína microbiana al duodeno (Yáñez-Ruiz et al., 2006, 2007), etc.

Los **hongos** pueden suponer hasta el 8% (10^3 - 10^6 células/ml de contenido ruminal) del total de la biomasa microbiana del rumen (Orpin, 1981) y desempeñan un importante papel en la degradación de los componentes estructurales de las plantas (Orpin y Bountiff, 1978; Akin y Rigsby, 1987).

La población de **virus** que lisan bacterias (bacteriófagos) en el rumen es muy elevada, existiendo estimaciones que la sitúan en 10^9 - 10^{10} partículas/ml (Paynter et al., 1969; Klieve y Bauchop, 1988; Klieve y Swain, 1993), con efectos beneficiosos sobre la función ruminal como el reciclado de la proteína bacteriana o el control de la densidad poblacional de determinadas especies bacterianas (Swain et al., 1996) y efectos negativos sobre la eficiencia de degradación del alimento y síntesis de proteína microbiana (Orpin y Munn, 1974; Swain et al., 1996).

2.1.2.4. Producción de metano y *Archaeas*

Las emisiones de metano a la atmósfera son un problema medioambiental (**Figura. 2.4**) de primer orden ya que este gas se encuentra estrechamente ligado al efecto invernadero y al

calentamiento global (Janssen y Kirs, 2008). Además, su formación en el rumen implica una reducción de la eficiencia de utilización de la energía de la dieta ya que supone una pérdida de entre 2-12 % de la energía bruta ingerida por el animal (Johnson y Johnson, 1995; McAllister et al., 1996; Moss et al., 2000). Estudios recientes (Steinfeld et al., 2006; Hook et al., 2010; Martín et al., 2010; Martínez-Sibaja et al., 2010) indican que los rumiantes juegan un papel importante en el cambio climático, contribuyendo aproximadamente con el 45% de las emisiones de metano de origen antrópico (NRC, 2003; Ellis et al., 2007). Algunos autores han estimado la producción anual de metano de la especies domésticas de rumiantes en 86 millones de Tg (toneladas métricas) de las que aproximadamente 9,5 proceden de ovejas y cabras, 18,9 de vacas de leche y 55,9 de vacuno de carne (McMichael et al., 2007). Si las emisiones de metano continúan aumentando al mismo ritmo que lo están haciendo los sistemas de producción dependientes de los rumiantes, se prevé un incremento del 60% en las emisiones de este gas para el año 2030 (FAO 2003). Este gas tiene un potencial efecto invernadero hasta 25 veces superior al del CO₂ (Forster et al., 2007), con una vida media en la atmósfera de 12 años, siendo además el segundo gas de efecto invernadero en volumen por detrás del CO₂ (Hook et al., 2010; Wright y Klieve, 2011).



Figura. 2.4. Imágenes de la Tierra tomadas por la NASA

Aproximadamente el 90% del metano emitido por los rumiantes se produce en el rumen y se exhala por la boca y la nariz (Wright et al., 2004a; Hook et al., 2010). La metanogénesis en el rumen se realiza por la acción de un grupo de *Archaeas* pertenecientes al phylum *Euryarchaeota*, conocidas comúnmente como metanogénicas. El metano se sintetiza a partir de H₂ y CO₂, producidos en la hidrólisis bacteriana de los carbohidratos, ayudando a su vez a regenerar cofactores

Capítulo 2

como el NAD⁺ (Hungate et al., 1970; Ørkov y Ryle, 1990; Wright y Klieve, 2011). Aunque la metanogénesis represente una pérdida de energía, es necesaria para evitar el acúmulo de H₂ que daría lugar a altas presiones de este gas en el rumen resultando en una inhibición de la fermentación microbiana ruminal (Sharp et al., 1998). A diferencia de las **Bacterias**, las *Archaeas* metanogénicas carecen de peptidoglicanos en su pared celular poseyendo, en su lugar, pseudomureina (*Methanobrevibacter* y *Methanobacterium*), heteropolisacáridos (*Methanosarcina*) o proteínas (*Methanomicrobium*) (Balch et al., 1979). Otra característica de las arqueas metanogénicas es que todas poseen la coenzima F₄₂₀, mientras que la coenzima M, la cual es metilada para producir metano, es también característica de este grupo. Sin embargo, pueden encontrarse archaeas, como las del género *Methanobacterium*, con capacidad para producir la coenzima M, mientras que otras especies, como *Methanobrevibacter ruminantium* requieren una fuente externa (Rouviere y Wolfe, 1988). Las archaeas del orden *Methanosarcinales* son las únicas que poseen citocromos, que les permiten crecer en un rango de sustratos amplio (Thauer et al., 2008). Sin embargo, las metanogénicas con citocromos tienen un crecimiento más lento que las que no lo poseen, siendo el crecimiento 10 veces más lento en las mismas condiciones. Los citocromos son transportadores de electrones presentes en la membrana, que juegan un papel importante en la oxidación de los grupos metilo a dióxido de carbono (Kühn et al., 1983). Otras características y diferencias entre las distintas especies y grupos de metanogénicas se recogen en la **Tabla. 2.1**.

Tabla 2.1. Características de distintas especies de Archaeas metanogénicas.

	<i>Pared celular</i>	<i>Motilidad</i>	<i>Citocromos</i>	<i>Sustratos utilizados</i>					
				<i>H₂</i>	<i>CO₂</i>	<i>Fórmico</i>	<i>Acético</i>	<i>Metilamina</i>	<i>Metanol</i>
<i>Methanobrevibacter ruminantium</i>	<i>Pseudomureina</i>	+ -	-	+	+	+	-	-	-
<i>Methanobacterium formicicum</i>	<i>Pseudomureina</i>	-	-	+	+	+	-	-	-
<i>Methanosarcina barkeri</i>	Heteropolisacáridos	-	+	+	+	-	+	+	+
<i>Methanosarcina mazei</i>	Heteropolisacáridos	-	+	-	-	-	+	+	+
<i>Methanomicrobium mobile</i>	Proteína	+	-	+	+	+	-	-	-

La diversidad de Archaeas metanogénicas en el rumen varía con la dieta, localización geográfica, hospedador y su estado productivo (Wright et al., 2006;

Hook et al., 2010). Como se ha indicado anteriormente las *Archaeas* presentes en los rumiantes se encuentran constituidas fundamentalmente por las clases *Methanobacteria*, *Methanomicrobia*, *Thermoplasmata* y *Methanopyri* (**Figura 2.5**), habiéndose demostrado en numerosos estudios realizados en todo el mundo (Australia, Canadá, Japón, Nueva Zelanda, y USA) que el género *Methanobrevibacter* es el más abundante (Whitford et al., 2001; Ouwerkerk et al., 2008; Wright et al., 2008, 2009). Dentro de la clase *Methanobacteria*, familia *Methanobacteriaceae* predominan 3 géneros: *Methanobrevibacter*, *Methanomicrobium* y *Methanosphaera* (50, 15 y 13% del total de archaeas, respectivamente), debido a su crecimiento relativamente rápido y su competitividad en la utilización del H₂ y CO₂ (Kim et al., 2011). No obstante, otros géneros o especies menos abundantes pueden estar íntimamente relacionados con la producción de metano. Estudios previos, utilizando vacunas contra los principales grupos de metanogénicas, no han tenido los efectos esperados en cuanto a emisiones de metano, e incluso han dado lugar a un incremento de la producción de metano en aquellos animales vacunados meses después de la vacunación (Wright et al., 2004b). Además, hoy aún se desconocen los géneros o especies de *Archaeas* más íntimamente relacionadas con el proceso de la metanogénesis en el rumen (Yu and Morrison, 2004).

Capítulo 2

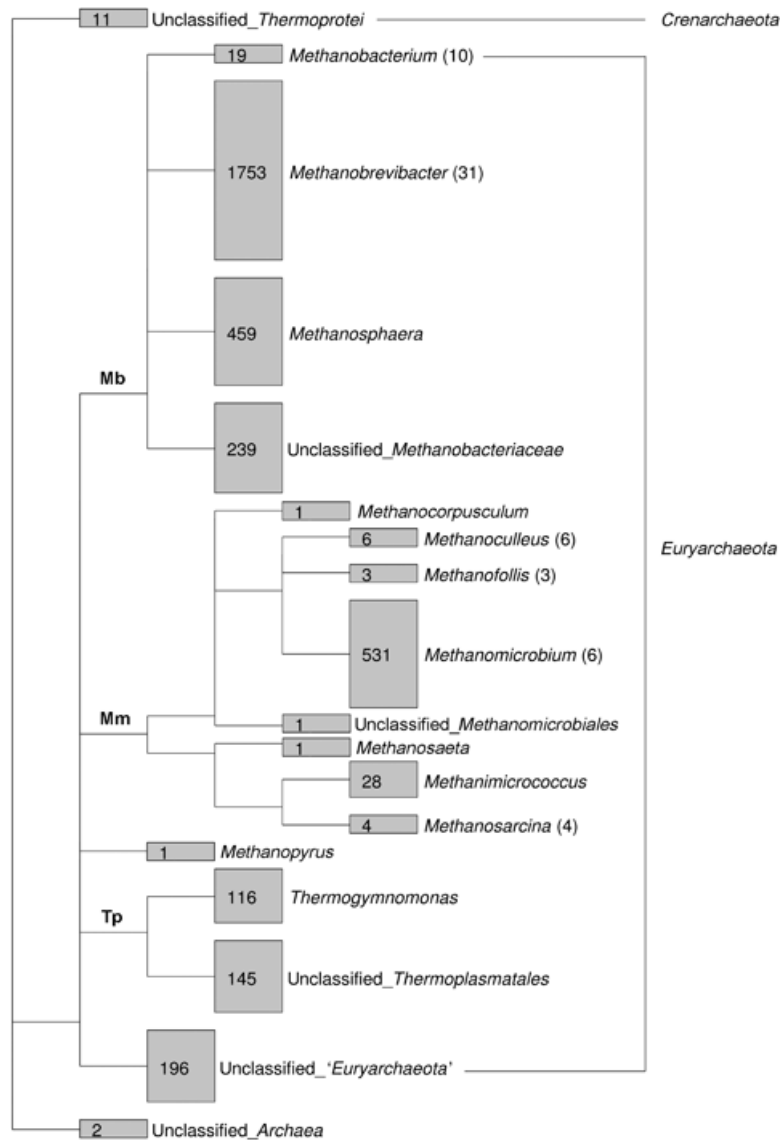


Figura 2.5. Árbol taxonómico de los distintos géneros de Archaeas presentes en el rumen (Kim et al., 2011)

La metanogénesis se puede ver afectada por numerosos factores como el pH, la concentración de AGVs en el rumen, el tipo de dieta, la forma de alimentación del animal, la especie animal o el estrés ambiental (Johnson y Johnson, 1995; Hironaka et al., 1996; McAllister et al., 1996; Denman et al., 2007; Kumar et al., 2009). En los últimos años se han estudiado numerosas estrategias para reducir las emisiones de metano en el rumen (Kebreab et al., 2006; Beauchemin et al., 2009; Kumar et al., 2009; Eckard et al., 2010; Martín et al., 2010; Shibata y Terada, 2010; Buddle et al., 2011) (**Tabla. 2.2**). Aunque el efecto inhibitorio de estas estrategias sobre la metanogénesis se ha demostrado, también se ha observado que algunas tienen efectos adversos sobre la utilización de nutrientes por parte del

animal. Además, el efecto antimetanogénico sólo se manifiesta a veces a corto plazo, como consecuencia de la adaptación de la microbiota del rumen a dichas estrategias (Kumar et al., 2009). Todo ello parece indicar que su aplicabilidad a los sistemas de producción actuales queda todavía un poco lejos. No obstante, en un futuro no lejano se podrían desarrollar nuevas opciones para reducir las emisiones de metano de los rumiantes, mediante la eliminación y control de las archaeas metanogénicas. En este sentido serán de gran utilidad una serie de herramientas moleculares (pirosecuenciación, SIP; Stable Isotope Probing), que ayudarán a entender mejor el papel que juegan estos microorganismos en el rumen y, lo que es más importante, cuales son las arqueas más directamente implicadas en la metanogénesis (Dumont and Murrell, 2005; Wright y Klieve, 2011).

Capítulo 2

Tabla 2.2. Principales estrategias estudiadas con objeto de reducir la producción de metano en rumiantes: mecanismos y consideraciones.

Estrategia	Mecanismo de acción	Consideraciones a tener en cuenta	Referencias
Composición de la dieta			
Aumento hemicelulosa/almidón	Incremento de la velocidad de paso; Aumento del ratio Acético:Propiónico; reducción del pH ruminal	Desvía la producción de metano hacia el intestino y heces; riesgo de acidosis	<i>Ellis et al. (2007); Johnson y Johnson. (1995); Holter y Young. (1992); Sauvant y Giger-Reverdin. (2007); Van Kessel y Russell. (1996); Hindrichsen et al. (2006).</i>
Reducción componentes de la pared celular			
Reducción tamaño partícula			
Lípidos			
Ácidos grasos	Inhiben las metanogénicas y los protozoos; Aumento del ratio Acético:Propiónico; biohidrogenación	Efecto sobre la palatabilidad, ingesta, desarrollo, y composición de la leche; varía con la dieta y la especie; se necesitan más estudios a largo tiempo	<i>Dohme et al. (2000, 2001); Kong et al. (2010); Eugéne et al. (2008); Beauchemin et al. (2007, 2008, 2009b); Martín et al. (2008, 2010); Machmüller et al. (2000, 2003a); Odongo et al. (2007); Soliva et al. (2004); McGinn et al. (2004); Jordan et al. (2006a,b); Cosgrove et al. (2008); Machmüller y Kreuzer. (1999); Grainger et al. (2010).</i>
Aceites vegetales			
Semillas			
Sebo			
Defaunación	Elimina las metanogénicas asociadas a protozoos; reducen la disponibilidad de H ₂	Adaptación de los microorganismos; varía con la dieta; mantenimiento de animales defaunados	<i>Machmüller et al. (2003b); Finlay et al. (1994); Newbold et al. (1995); Hegarty et al. (1999, 2008); Morgavi et al. (2008); Guan et al. (2006).</i>
Vacunas	Actúa sobre la respuesta inmune del hospedador contra las metanogénicas	Especificidad de las vacunas; variabilidad entre dietas y localización geográfica	<i>Wright et al. (2004b); Williams et al. (2009); Wedlock et al. (2010).</i>
Oxidación del metano	Tratan de aumentar la actividad de las bacterias ruminales que oxidan el metano, reduciendo así su acumulación en el rumen	La oxidación de metano en el rumen es muy limitada 0,3-8%, las bacterias implicadas necesitan oxígeno para crecer, poca aplicabilidad.	<i>Valdes et al. (1996); Boadi et al. (2004).</i>
Ionóforos	Inhibe a los protozoos y las bacterias Gram +; reducen el sustrato para la metanogénesis	Adaptación de la microbiota; varía con la dieta y animal; utilización prohibida	<i>Guan et al. (2006); Sauer et al. (1998); Bergen y Bates. (1984); Russell y Strobel. (1989); Chen y Wolin. (1979); Van Nevel y Demeyer. (1977); Odongo et al. (2007); Hook et al. (2009).</i>
Componentes bioactivos			
Taninos	Actividad antimicrobiana; reducen la disponibilidad de H ₂	Dosificación óptima desconocida; se necesitan más investigaciones <i>in vivo</i> y a largo plazo; efectos negativos en digestibilidad; Presencia de residuos	<i>Tavendale et al. (2005); Puchala et al. (2005); Tiemann et al. (2008); Beauchemin et al. (2007b); Oliveira et al. (2007); Guo et al. (2008); Holtshausen et al. (2009); Burt. (2004); Calsamiglia et al. (2007); Beauchemin y McGinn. (2006); Patra y Saxena. (2010).</i>
Saponinas			
Aceites esenciales			
Otros			
Ácidos orgánicos			
Fumarato	Actúan como sumidero de electrones; Aumento del ratio Acético:Propiónico	Varía entre dietas; se necesitan más estudios <i>in vivo</i> y a largo plazo; puede afectar a la digestibilidad	<i>Wood et al. (2009); Molano et al. (2008); Foley et al. (2009).</i>
Malato			

2.1.3. Síntesis de proteína microbiana

Los aminoácidos disponibles para el animal en el duodeno tienen tres orígenes: la proteína del alimento que no ha sido degradada en el rumen, la proteína endógena procedente de descamaciones celulares y jugos digestivos, y la proteína microbiana sintetizada en el rumen (ARC, 1980; Van Soest, 1982; Schniffen y Robinson, 1987; Stern et al., 1994). A pesar de que la síntesis de proteína microbiana es un factor primordial en los sistemas de valoración proteica de alimentos para rumiantes (Clark et al., 1992; Firkins et al., 1998), su cuantificación resulta enormemente compleja. Entre los factores más importantes que influyen en la síntesis de proteína microbiana en el rumen se pueden destacar los siguientes: disponibilidad de energía, aporte de distintas formas de nitrógeno, sincronización entre el aporte de energía y de nitrógeno, renovación protozoaria, presencia de grasas insaturadas en el alimento, ritmo de tránsito de la dieta, nivel de alimentación y presencia de factores no nutritivos (Bach et al., 2005), siendo los factores de origen dietético y, en segundo lugar, los de carácter metodológico los principales responsables de la variabilidad observada (Broderick y Merchen, 1992; Dewhurst et al., 2000; Ranilla et al., 2001; Tas y Susenbeth, 2007).

Cuando se considera la proteína microbiana en rumiantes, hay que tener en cuenta que síntesis y flujo no son conceptos equivalentes, debido a que un porcentaje de la proteína microbiana sintetizada en el rumen no fluye al intestino debido al reciclado del N, principalmente como consecuencia de la predación de bacterias por protozoos (Firkins, 1996). En la práctica, el flujo de proteína microbiana al intestino suele estimarse como la proteína de origen microbiano, sintetizada en el rumen, que llega al duodeno, ya que esta constituye la fracción que realmente puede aprovechar el animal hospedador para cubrir sus necesidades. El reciclado del N microbiano en el rumen ha sido estimado en un 30 – 50% de la proteína microbiana sintetizada, aunque algunos autores han establecido rangos más amplios (20-90%), en función de la dieta suministrada al animal. La mayor parte del N microbiano tiene un origen bacteriano puesto que aunque los protozoos representen un alto porcentaje de la microbiota ruminal, su retención selectiva o secuestro en el rumen hace que su contribución al flujo duodenal de proteína microbiana no sea superior al 30% (Dijkstra et al., 1998; Reynal et al., 2003; Yáñez-Ruiz et al., 2006).

Capítulo 2

La utilización de los ácidos nucleicos y de sus derivados metabólicos como marcadores microbianos para la estimación de la síntesis y flujo de proteína microbiana, implica asumir que, a pesar de que el contenido en ácidos nucleicos de los alimentos es importante, se produce una degradación ruminal masiva de los mismos, de forma que aquellos que alcanzan el duodeno son de origen exclusivamente microbiano (Smith y McAllan, 1970; Chen et al., 1990; Balcells et al., 1991; Belenguer et al., 2002; Mota et al., 2008). La información disponible, relativa a la degradabilidad de las purinas de origen alimenticio es contradictoria (**Figura. 2.6**). Algunos autores (McAllan y Smith, 1973; Scheling y Bryers, 1984) consideran que el flujo duodenal de las purinas alimentarias es insignificante. Por el contrario, otros autores (Smith et al., 1978; Pérez et al., 1997) señalan que, dependiendo de la ración, hasta un 30 % de las purinas que llegan a duodeno son de origen alimenticio.

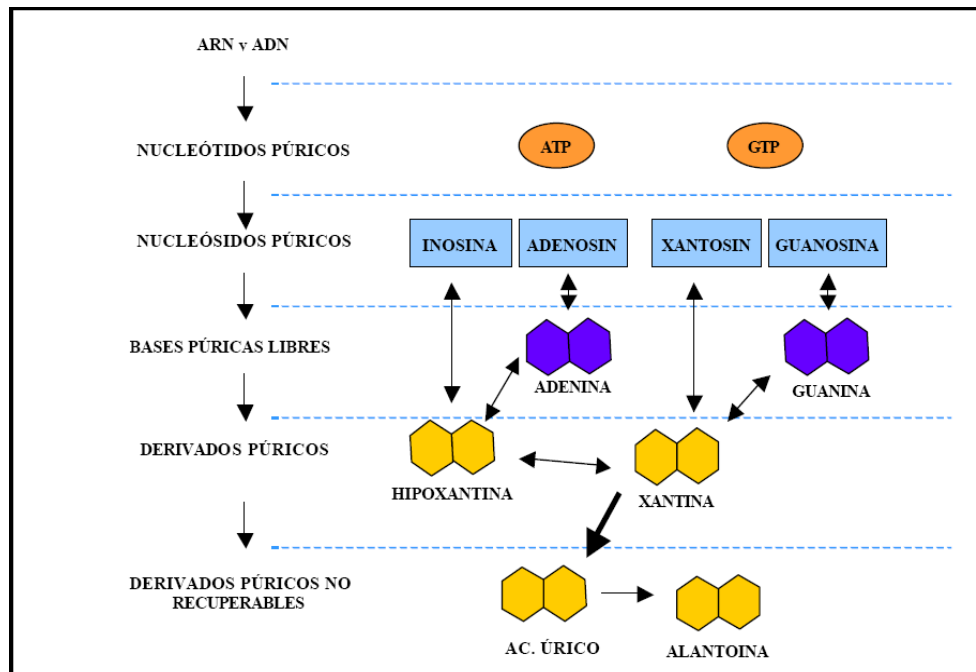


Figura 2.6. Metabolismo de los ácidos nucleicos en rumiantes

2.1.3.1. Excreción de derivados púricos en orina

En general, es posible estimar el aporte duodenal de purinas a partir de la excreción urinaria de derivados púricos (**DP**) si se asume una tasa de recuperación constante (Balcells, 1991; Martín-Orúe et al., 2000). La excreción de DP (alantoína, ácido úrico, hipoxantina y xantina) en orina es un índice fiable, que se utiliza frecuentemente para la estimación del flujo de N microbiano al duodeno de rumiantes como método no invasivo. Las tasas de recuperación, obtenidas mediante

los modelos propuestos en ovino, son muy similares (0,84; Chen et al., 1990 y 0,80; Balcells et al., 1991), al igual que en los modelos propuestos para caprino en mantenimiento (0,76; Belenguer et al., 2002) y lactación (0,74; Mota et al., 2008). Lo que constituye un indicio de que entre 15 y 25 % de las purinas absorbidas se excretan a través de alguna vía distinta a la orina. Una de las ventajas de estos modelos es que la variabilidad de la excreción de los DP en orina es menor que la de la del flujo de bases púricas (**BP**) al duodeno (González-Ronquillo et al., 2004). Aunque la ecuación de predicción ignora la variabilidad del flujo de BP al duodeno, del que depende estrechamente, la predicción de las BP absorbidas en duodeno o la ecuación elegida, influyen en la estimación de la síntesis de proteína microbiana. Por eso es necesario realizar más ensayos encaminados a validar los modelos de repuesta propuestos para las distintas especies animales y situaciones fisiológicas y de alimentación (Cantalapiedra-Hijar et al., 2009).

Terroine y Mourot (1931) observaron que la excreción de alantoína en la orina de ovinos aumentaba al hacerlo el nivel de proteína ingerida. Desde entonces se han realizado numerosos intentos de establecer la relación entre la excreción de DP en orina y el aporte duodenal de purinas (Blaxter y Martín, 1962; Elliot y Topps, 1963; Ellis y Bleichner, 1969; Antoniewicz et al., 1980; Sibanda et al., 1982; Giesecke et al., 1984; Fujihara et al., 1987; Chen et al., 1990; Balcells et al., 1991; Khan y Nolan, 2000; Belenguer et al., 2002; Prasitkusol et al., 2002; González-Ronquillo et al., 2003; Mota et al., 2008). Los resultados obtenidos son muy variables y revelan que, en términos equimolares, entre un 26 y un 100 % de las bases infundidas se recuperan en la orina en forma de alantoína y otros DP. Las variaciones se deben, fundamentalmente, a diferencias metodológicas, pero en todo caso, la observación repetida de valores bajos ratifica la existencia de vías alternativas de excreción así como la retención de las bases absorbidas en los ácidos nucleicos tisulares.

2.2. EL SECTOR CAPRINO

2.2.1. Sistemas de producción e importancia socioeconómica

El caprino representa una alta proporción del total de rumiantes de producción en el mundo (900 millones de cabezas), situándose en tercer lugar tras el vacuno (1430 millones) y el ovino (1000 millones), y en cuarto lugar tras el porcino (960 millones). Más del 90% del ganado caprino se encuentra en países con bajos ingresos (países no desarrollados y en vías de

Capítulo 2

desarrollo), especialmente en zonas desfavorecidas de Asia y África, y otros países de la Cuenca del Mediterráneo. En estas zonas, con gran escasez de pastos, la producción animal está limitada. El caprino tiene un importante papel ambiental por contribuir al control de fuegos y a la sostenibilidad de los ecosistemas (Castel et al., 2007) y socioeconómico por contribuir al mantenimiento de la población rural en determinadas zonas (Morand-Fehr et al., 2004; Boyazoglu et al., 2005). Actualmente el medio rural español ocupa el 90% del territorio nacional y acoge un 25 % de la población del país. También alberga la práctica totalidad de nuestra diversidad biológica y paisajística, y es origen y depositario de nuestra base cultural. Por ello se ha establecido el Plan de Desarrollo Rural (PDR) 2007-2013, que trata de proteger y fomentar el desarrollo en las áreas rurales y más desfavorecidas, en cuyo programa la mujer juega un papel clave. Se destacan los factores positivos ligados al manejo sostenible de rebaños caprinos de nuestras razas autóctonas que, gracias a su buena adaptación al medio, contribuyen a mantener en condiciones agroambientales adecuadas el medio rural, a través de su fuerte vínculo con el territorio, asegurando la presencia humana en las zonas rurales menos favorecidas.

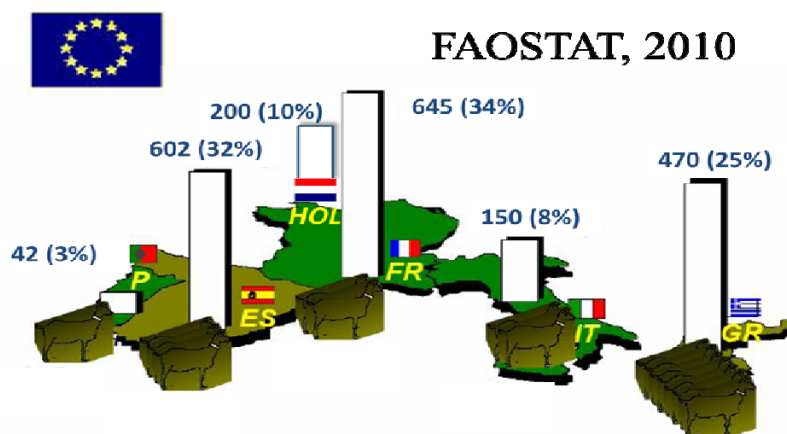


Figura 2.7. Principales países productores de leche en la UE y sus producciones.

En Europa, el ganado caprino representa casi el 2% del total mundial (16,5 millones de animales). En el contexto europeo, Grecia ocupa el primer lugar en cuanto a número de cabezas de caprino ya España es el segundo (2,8 millones de animales), seguida de Rusia, Francia e Italia. El censo caprino español se encuentra integrado por razas autóctonas prácticamente en su totalidad, destacando las razas Murciano-granadina, Majorera, Malagueña, Florida, Payoya, Palmera y Tinerfeña. Si se considera la producción de leche, Francia ocupa el primer lugar seguida de España (602.000 Tm) y Grecia, por ese orden (**Figura 2.7**; FAOSTAT, 2010). España representa el 21 % de la

Renta Final Ganadera si se considera la producción de leche, correspondiendo a la de cabra el 10,7% muy inferior a la de la leche de vaca, que supone el 75,8%. Ello significa que el sector caprino aporta el 2,2 % aproximadamente de la renta total ganadera nacional. En España, las principales zonas productoras son: Andalucía (36,3 %), Castilla-la Mancha (13,3 %), Canarias (12,4 %), Extremadura (10,2 %), Castilla y León (6,7 %) y Murcia (6,4 %) según datos del MARM (2010). La producción de leche de cabra se caracteriza por una evolución desigual de precios (por hectogrado: grasa + proteína), con marcadas variaciones estacionales (5,4-7,5 €/Hgdo), y una creciente dependencia del comercio intracomunitario, con Francia como destino final prioritario de leche y cuajada, que representan un volumen superior a las 50.000 t por año. España compite con los productores más dinámicos de nuestro entorno, Francia y Holanda, en cuanto a producción de quesos frescos y madurados.

El excedente de leche cruda de cabra en España, en el año 2010, fue de 45.000 t, de las cuales 25.000 t corresponden al aumento de producción, 12.000 t a la reducción de las compras de Francia y el resto (8.000 t) pueden atribuirse a la caída del consumo. Esta situación debería comenzar a corregirse por la disminución que ha experimentado el censo de caprino, que era de 2.835.481 cabezas en 2010. Aunque durante los últimos años se observa una tendencia a la intensificación y orientación lechera de las explotaciones de caprino en España (Mena-Guerrero et al., 2005), el marco actual en el que se sitúa este sector pone de manifiesto la necesidad de establecer una serie de medidas para mejorar su competitividad (Castel et al., 2003 y 2010; Mena et al., 2005; Escuder et al., 2006; Sanchez et al., 2008), como *i*) fomentar la industria basada en los productos caprinos, *ii*) formación y apoyo a los ganaderos en el ámbito público y privado, *iii*) caracterización, evaluación, promoción y comercialización de sus productos, aprovechando las ventajas que ofrecen las marcas de calidad, *iv*) favorecer las condiciones de vida e ingresos de los ganaderos, para asegurar su permanencia en el ámbito rural, *v*) fomentar la investigación en el sector a nivel nacional e internacional, tratando de establecer una estrecha relación entre el ganadero, organismos de investigación y empresas.

La producción de queso de cabra en España se ha incrementado de manera gradual en los últimos años, pasando de 14.000 toneladas en el año 2005 a 21.600 toneladas en 2007. A partir de estos datos, aplicando un coeficiente de transformación de 10 litros de leche necesarios para fabricar 1 kg de queso, únicamente el 40% de la leche de cabra se

Capítulo 2

destina en España a la fabricación de queso. La proporción del consumo de leche líquida respecto al total sigue siendo muy bajo y está limitado a determinadas zonas de demanda tradicional. La introducción de nuevas presentaciones, en envases de cartón mixto multicapa y otros, hace que el producto llegue con más facilidad al consumidor y debe facilitar su consumo. La industria láctea, tanto de dimensión nacional como local, suele utilizar leche de varias especies (cabra-oveja o cabra-oveja-vaca) para optimizar su proceso de fabricación y aumentar la oferta y asequibilidad de sus quesos. Algunos transformadores están, sin embargo, especializados en productos lácteos obtenidos de caprino exclusivamente, en el ámbito de denominaciones de origen protegidas (**DOP**) o cooperativas.

Los sistemas de explotación de caprino españoles son heterogéneos pero tienen en común un marcado carácter familiar, una deficiente tecnificación y gestión económica y una tendencia hacia la intensificación (Mena-Guerrero et al., 2005). Los sistemas extensivos son escasos y se dedican fundamentalmente a la explotación de razas cárnicas (Castel et al., 2003). La producción lechera anual varía entre 400-800 L de leche, en función del potencial genético de la raza y del grado de intensificación de la explotación, que a su vez influye en la estacionalidad de la producción de leche (Sánchez et al., 2002). Al mismo tiempo la venta de carne de chivo puede llegar a suponer 10-20% de las ganancias en la explotación.

2.2.2. Alimentación del ganado caprino

El suministro de energía representa, generalmente, el componente más costoso de una dieta y el principal factor limitante de la producción animal. En España el uso de concentrados en la alimentación caprina es una práctica cada vez más extendida, tanto en sistemas intensivos como semi-intensivos, y ha sido considerado excesivo en los sistemas andaluces (Mena-Guerrero et al., 2005, 2009), aunque existan discrepancias en cuanto a los rendimientos productivos y económicos obtenidos (Mena-Guerrero et al., 2005). El objetivo de su empleo es incrementar la ingesta y digestibilidad de la dieta (INRA, 1988; Bargo et al., 2002), conceptos muy relacionados entre sí (Dixon y Stockdale, 1999). El bajo contenido en lignina, mayor contenido en carbohidratos fácilmente degradables y el menor tamaño de partícula de los concentrados basados en cereales determinan su elevada digestibilidad (Dijkstra, 1994; Bannink et al., 2006). Mediante el uso de concentrados se consigue incrementar el aporte neto de nutrientes,

fundamentalmente energía y proteína, en aquellos períodos en que los recursos forrajeros no pueden cubrir las necesidades específicas del ganado. Las características físico-químicas de los concentrados conllevan, por un lado, una disminución del tiempo de masticación y rumia del ganado (Santini et al., 1992) y, por otro lado, una rápida colonización y fermentación por la microbiota del rumen. Un rápido acceso de los microorganismos del rumen a sustratos fácilmente fermentables promueve un aumento en la producción de ácidos grasos volátiles y de proteína microbiana, lo que se traduce en un mayor aporte de energía metabolizable (**EM**) y de proteína metabolizable (**PM**) o digestible en el intestino (**PDI**). Por el contrario, la rápida ingestión de los concentrados y el menor tiempo de rumia que requieren determinan una menor producción de saliva, lo que unido a su extensa fermentación en el rumen da lugar a una disminución del pH, tanto más acusada cuanto mayor sea la proporción de concentrado en la dieta y cuanto mayor sea la proporción de carbohidratos solubles, fácilmente fermentables, en dicho concentrado. Los efectos de la disminución del pH en el rumen son bien conocidos; su consecuencia más inmediata es la disminución de la actividad celulolítica de los microorganismos (Mould et al., 1983; Mould y Ørskov, 1983; Hoover, 1986; Russell y Wilson, 1996) y, en consecuencia, de la digestión de la fibra (Ørskov y Fraser, 1975; Mould et al., 1983; Ørskov, 1999). Además, cuando el pH desciende por debajo de ciertos valores no solo se modifica el metabolismo ruminal, disminuyendo la eficiencia de utilización de los nutrientes de las dietas, sino que, a largo plazo, puede ocasionar serios problemas de salud al rumiante (cetosis, laminitis, infertilidad, etc.). Parece, pues, que en cada momento de producción ha de existir un equilibrio entre los beneficios potenciales del uso de concentrados y las desventajas de un aporte excesivo. Dicho equilibrio depende del tipo de forraje y de la cantidad y calidad del concentrado adicionado (Dulphy et al., 1982; Giger, 1987).

El suministro de concentrados a los rumiantes modifica la cantidad de forraje ingerido (Moorby et al., 2006) y la digestibilidad de la dieta (Madrid et al., 1997), siendo estos efectos o interacciones (Berge y Dulphy, 1991) menos importantes en mantenimiento que en producción (Wainman et al., 1981). Los principales factores que determinan estas interacciones son, *i*) la proporción de concentrado en la ración (Dulphy et al., 1983; Guérin y Dulphy, 1984; Faverdin et al., 1991; NRC, 2001), *ii*) la naturaleza del forraje (INRA, 1978; Dulphy et al., 1983) y del concentrado (Vérité y Dulphy,

Capítulo 2

1981; Dulphy et al., 1982; Guérin y Dulphy, 1984; Ørskov, 1999), *iii*) y el nivel de alimentación de los animales (Edionwe y Owen, 1989).

El hecho de que la interacción entre la digestibilidad del forraje y la del concentrado dependa de numerosos factores y que el término concentrado englobe a alimentos de naturaleza muy diversa, podría explicar las controversias encontradas en la bibliografía respecto a la idoneidad de aumentar el concentrado en las dietas de rumiantes por encima de ciertos niveles. Varios autores han encontrado respuestas positivas a la adición de concentrados, por encima de cierto porcentaje, en la digestibilidad y/o ingesta de MS (Kawas et al., 1991; Andersen et al., 2003; Moorby et al., 2006; Tripathi et al., 2007; Tufarelli et al., 2009; Owens et al., 2008), la síntesis de proteína microbiana (Moorby et al., 2006; Owens et al., 2008), la producción de leche, la eficiencia de utilización de los alimentos y ganancia de peso (Khalili y Sairanen, 2000; Yang et al., 2001b; Andersen et al., 2003; Andrade y Schmidely, 2006; Moorby et al., 2006; Tripathi et al., 2007; Tufarelli et al., 2009). Otros autores no han observado incrementos en alguno o varios de estos parámetros (Faverdin et al., 1991; Kawas et al., 1991; Richards et al., 1994; Andrade et al., 1996; Liu et al., 2005; Andrade y Schmidely, 2006; Lascano y Heinrichs, 2009). En algunos trabajos se ha constatado que la adición de concentrados a la dieta tiene efectos positivos hasta alcanzar un determinado nivel a partir del cual no existe efecto o este es negativo (Chandramoni et al., 2000; Goetsch et al., 2001; Dung et al., 2005; Liu et al., 2005; Lefrileux et al., 2008). Como se ha mencionado anteriormente la utilización de alimentos concentrados debe adecuarse a las necesidades productivas del animal y a la disponibilidad de recursos alimenticios en la explotación. Además, a efectos prácticos y como consecuencia del comportamiento selectivo de las cabras frente al alimento, el uso de concentrados es una herramienta muy útil ya que evita diferencias entre animales debidas a la selección ayudando a mantener la homogeneidad de los lotes dentro de cada rebaño.

2.2.2.1. Fluctuación en el precio de los cereales e impacto en la producción caprina

Los forrajes constituyen el alimento básico para rumiantes, pero diversas causas como una baja disponibilidad y/o calidad de los pastos, el aumento de las necesidades alimenticias de los animales en algunos estadios fisiológicos, la tendencia a la intensificación de los sistemas productivos y la estacionalidad de los pastos determinan un incremento en el uso de concentrados en el área

Mediterránea. Ello implica un incremento en el coste de la alimentación (Ben Salem y Nefzaoui, 2003; Wright et al., 2004a). Los concentrados están constituidos mayoritariamente por cereales, cuyo cultivo es uno de los más importantes en el mundo, tanto por la superficie que ocupan como por su producción.

En la última década, el precio de los cereales ha experimentado un notable incremento (**Figura 2.8**), aproximadamente de un 48% (FAO, 2011). Según datos del Boletín Mensual de Estadística del MARM, actualizados a Marzo del 2012, el precio de los cereales se situó en 241, 219 y 216 euros por tonelada (trigo, cebada y maíz, respectivamente), lo que supone un incremento de un 35% con respecto a marzo del año 2010. En 2007, se vivió una situación similar cuando los cereales, que llevaban treinta años manteniendo los precios en la cuota más baja, subieron hasta alcanzar récords históricos. Esta subida de precios de los cereales y de otros alimentos generó una crisis alimentaria a nivel mundial en 2008. Diversos factores pueden estar relacionados con este aumento de precios: la fuerte interdependencia de la agricultura y los mercados no agrícolas (energía, industria, finanzas, etc.), derivada del fenómeno de la globalización; el desacople entre el crecimiento de la población, de patrón geométrico, y la producción de alimentos, de progresión aritmética; un fuerte incremento de la demanda en algunos países; las malas cosechas en los principales países productores; el uso de parte de la producción para obtener biocombustibles; y la especulación financiera (Tomás, 2008). Los cereales se dedican actualmente a la alimentación humana, a la producción de bebidas alcohólicas y no alcohólicas y a la producción de biocombustibles. Por otra parte, las sequías e inundaciones recientes, acaecidas en países productores (Rusia y Australia), así como la crisis política en ciertos países del Magreb y Oriente Próximo, con sus repercusiones en el suministro de petróleo y el incremento de la demanda en países emergentes como China podrían determinar un nuevo incremento de los precios de los cereales similar o mayor al que se produjo en 2008.

Capítulo 2

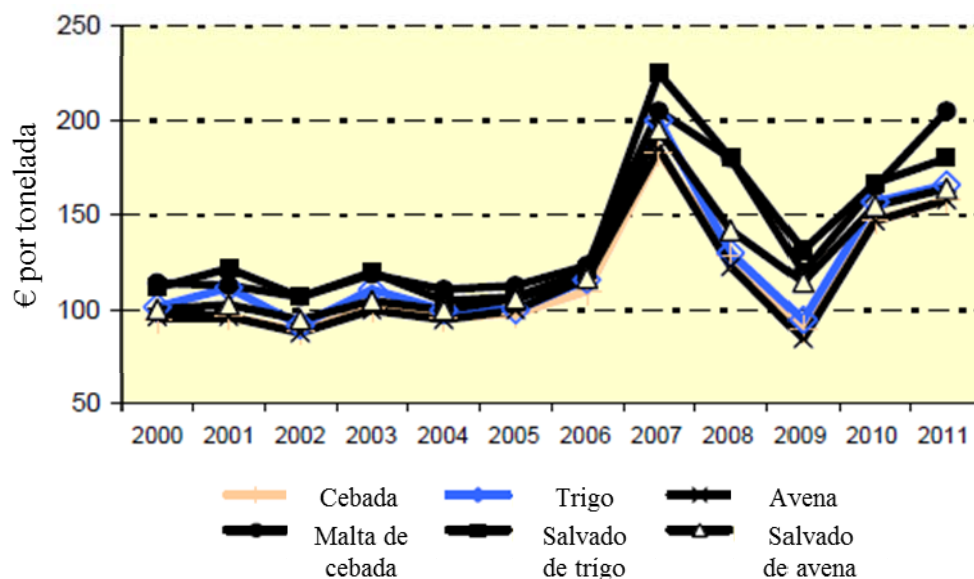


Figura 2.8. Evolución del precio de los cereales en el período 2000-2011.

2.2.2.2. Estrategias para reducir el consumo de cereales en la alimentación del ganado caprino.

Los sistemas de producción caprina suelen desarrollarse, como se ha mencionado previamente, en países de climatología adversa en los que la escasez de agua repercute negativamente en la producción agrícola y la disponibilidad de pastos. Es por ello que la producción caprina semi-intensiva requiere la importación de alimentos concentrados, en aquellos meses en que los recursos naturales no son suficientes para cubrir las necesidades energéticas de los animales, sobre todo de animales en producción. Muchos autores han desarrollado estrategias de alimentación, aplicables a pequeños rumiantes, con objeto de incorporar alimentos autóctonos, de bajo coste que sustituyan parcialmente los concentrados comerciales (El Hag et al., 2002; Ben Salem, 2003, 2010; Ben Salem y Znaidi 2008; Ventura et al., 2009; Molina-Alcaide et al., 2009, 2010a; Abbeddou et al., 2011a, b), cuyos precios se han disparado en los últimos años (FAO, 2011). Entre las estrategias a utilizar se consideran las siguientes:

- Utilización de arbustos y hojas de leguminosas autóctonas (Richards et al., 1994; Molina-Alcaide et al., 1997; Ben Salem et al., 2001; Landau et al., 2000)
- Forrajes de calidad autóctonos (Morales et al., 2000; Goetsch et al., 2001)
- Subproductos agroindustriales, que en función de su grado de humedad se ofrecen:
 - o Directamente (Ventura et al., 2009; Greenwood et al., 2012)

- Ensilados (Fondevila et al., 1994; Weiss et al., 1997; Denek y Can, 2006)
- Bloques multinutrientes (Ben Salem y Nefzaoui, 2003; Molina-Alcaide et al., 2009, 2010a)
- Pellets (Ben Salem y Makkar et al., 2010).

Sin embargo, su inclusión en dietas de animales lecheros debe controlarse debido a su valor nutritivo bajo-medio y a los elevados requerimientos nutritivos de animales de alta producción (Vasta et al., 2008; Abbeddou et al., 2011a, b).

2.2.3. Utilización de subproductos en alimentación de rumiantes

Puesto que el panorama de precios de los cereales para los próximos años no es alentador, el uso de alimentos no convencionales como los residuos y subproductos agroindustriales, que han adquirido una gran importancia en la alimentación de rumiantes, en especial en regiones cálidas y templadas del planeta, puede representar una vía para reducir el uso de concentrados si no se compromete la productividad o calidad de los productos animales (Aghsaghali y Maheri-Sis, 2008; Vasta et al., 2008). La utilización de subproductos en la alimentación del ganado ha tenido cierta importancia tradicionalmente, utilizándose principalmente salvados, tortas, harinillas, bagazo de cerveza, pulpa de remolacha, melazas, etc. En las últimas décadas han comenzado a considerarse subproductos, desríos y desechos procedentes del cultivo y las industria de frutas y hortalizas, sueros, y subproductos de la industria culinaria, siendo importante evaluar su calidad nutritiva cuando se incluyen la la dieta de los animales. Por otro lado, la gestión ambiental de residuos agroindustriales es potencialmente peligrosa, pudiendo generar problemas severos (eutroficación de aguas, contaminación de suelos, agua y aire). El empleo de residuos y excedentes de producción de cultivos de invernadero en la alimentación de rumiantes puede ayudar a reducir los costes de producción, paliar el problema de la gestión de estos residuos (Aghsaghali y Maheri-Sis, 2008) y la competencia con los humanos en cuanto a los recursos alimentarios a utilizar. No obstante, la utilización de subproductos tiene inconvenientes como la posible variación en su composición y disponibilidad a lo largo del año, la presencia de contaminantes orgánicos e inorgánicos (Grasser et al., 1995; Mussatto et al., 2006) y un contenido en nutrientes de calidad media-baja. Sin embargo, en combinación con otros subproductos e ingredientes y mediante una formulación adecuada de las dietas se pueden superar los mencionados inconvenientes. De

Capítulo 2

cara a su empleo como alimentos para rumiantes, en Andalucía, los desechos de frutos de tomate y pepino de invernaderos presentan la doble ventaja de estar disponibles durante la mayor parte del año y en cantidades importantes. No obstante, las marcadas oscilaciones del valor de los productos hortícolas en origen pueden determinar una gran variabilidad en el volumen de destríos a lo largo del año (**Figura 2.9**).

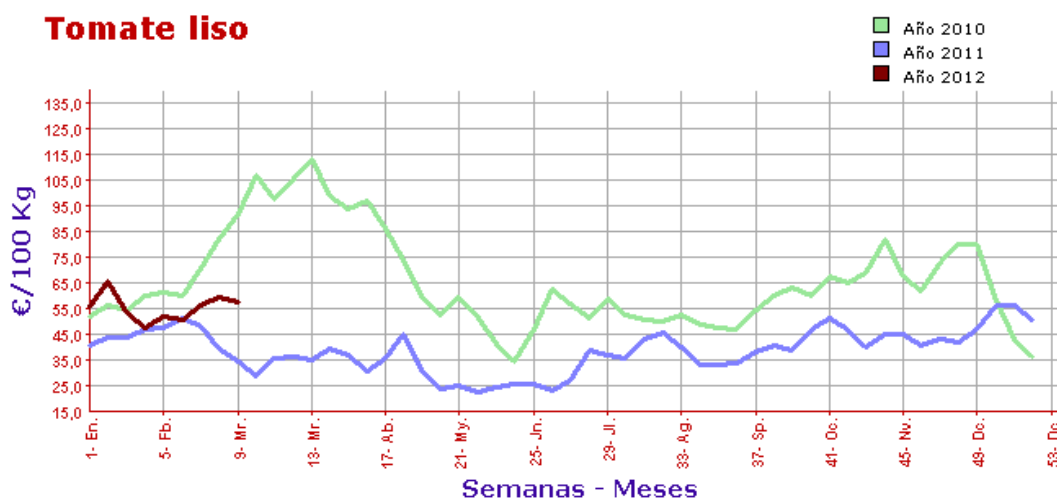


Figura 2.9. Fluctuaciones del precio del tomate redondo liso en el periodo 2010- 2012 (MARM, 2012).

España es el país de la Unión Europea con más superficie (62.283 Ha) dedicada al cultivo bajo cubierta o de “invernadero” (MARM, 2011). La producción se localiza principalmente en Andalucía, con más del 70% de la superficie nacional de invernaderos. Este tipo de cultivo genera una abundante cantidad de residuos de distinta índole: hojas, ramas y frutos diversos, constituyendo estos una importante fuente potencial de nutrientes para el ganado. El tomate y el pepino son dos de los productos hortofrutícolas más abundantes del sector primario en España (10700 y 1620 Ha, respectivamente). La producción total de tomate y pepino en 2011 fue de 3,83 millones y 698.000 Tm, respectivamente, siendo el 1º y 5º frutos de hortalizas más abundantes en ese año (MARM, 2011). Según estimaciones del año 2010, España se situaría en cuarto lugar en cuanto a la producción de tomate entre los países de la Cuenca Mediterránea, tras Egipto, Turquía e Italia, generando un 19% de la producción total de este fruto de toda la Unión Europea (FAO STAT 2010). La producción relativa de pepino en España, con respecto a la Unión Europea, es más difícil de establecer puesto que las estadísticas existentes son de producción conjunta de pepinos y pepinillos (FAOSTAT, 2010). España se sitúa como segundo país productor de pepinos y pepinillos en la Cuenca

Mediterránea, por detrás de Turquía. En 2011, Andalucía fue la región con mayor producción de tomate (293.468 toneladas), seguida muy de cerca por Extremadura, alcanzando la producción en ambas comunidades el 70% del total nacional. La estacionalidad y el sistema de cultivo varían según comunidades: en Andalucía se produce tomate durante todo el año, mientras que en Extremadura y Murcia la recolección del mismo se realiza de junio a diciembre y de octubre a mayo, respectivamente. La bibliografía disponible indica que, si bien la pulpa de tomate, que se genera en la elaboración de salsas o conservas, se ha estudiado en cuanto a su potencial como fuente de nutrientes para rumiantes (Fondevila et al., 1994; Denek y Can, 2006; Ben Salem y Znaidi, 2008; Abbeddou et al., 2011a), solo se ha encontrado un trabajo que estudia la calidad nutritiva y la digestibilidad del fruto del tomate (Ventura et al., 2009) y, ninguno en relación al fruto del pepino. Es, por tanto, de gran interés explorar el potencial de los desechos de frutos de tomate y pepino como fuentes de nutrientes para rumiantes.

2.2.3.1. Efectos digestivos y sobre la fermentación ruminal

El uso de subproductos agroindustriales en la nutrición de rumiantes se ha realizado con éxito como estrategia para reducir los costes de la alimentación, sin que se hayan apreciado efectos negativos sobre el rendimiento productivo de los animales (Morales et al., 2000; Malau-Aduli et al., 2003; Ben Salem y Makkar, 2010). Así, se utilizan pulpas de cítricos (Bueno et al., 2002), productos derivados de la industria oleica (Ben Salem et al., 2003; Yañez et al., 2004a y b; Ben Salem y Znaidi, 2008; Molina-Alcaide y Yañez-Ruiz, 2008; Molina-Alcaide et al., 2009, 2010a), subproductos del algodón (Belew y Ademilola, 2002), pulpa de remolacha (Olfaz et al., 2005), de manzana (Pirmohammadi et al., 2006; Fazlollah-Ghoreishi et al., 2007), orujo de uva (Greenwood et al., 2012), o subproductos del tomate (Gasa et al., 1989; Fondevila et al., 1994; Weiss et al., 1997; Denek y Can, 2006; Ben Salem y Znaidi, 2008; Ventura et al., 2009; Romano et al., 2010; Abbeddou et al., 2011a). Otros autores han puesto de manifiesto las ventajas que conlleva la fabricación local de alimentos concentrados con recursos autóctonos, cuya utilización no disminuye significativamente la producción de los pequeños rumiantes (Mahgoub et al., 2005; Aregheore et al., 2006; Das y Ghosh, 2007; Ben Salem y Makkar, 2010). Otros, sin embargo, han observado una disminución de la productividad (Mahgoub et al., 2007). Muchos de los estudios realizados en este sentido se han centrado en el ganado caprino (Madrid et al., 1997, 1998; Belew y Ademilola, 2002;

Capítulo 2

Bueno et al., 2002; Ben Salem et al., 2003; Yáñez-Ruiz et al., 2004a, b; Molina-Alcaide y Yáñez-Ruiz, 2008; Molina-Alcaide et al., 2009, 2010a), especie que parece especialmente adecuada para el aprovechamiento de alimentos de baja calidad nutritiva (Molina-Alcaide et al., 1997; Silanikove, 2000). Además, algunos autores (Newbold et al., 2004; Guo et al., 2008; Powell et al., 2009; Wang et al., 2009; Woodward et al., 2009; Ben Salem y Makkar, 2010; Patra y Saxena 2010; Greenwood et al., 2012) sugieren que la utilización de dichos subproductos puede tener ventajas derivadas de la presencia de compuestos secundarios o bioactivos con distintas actividades como la reducción de la producción de metano y del nitrógeno en orina, aspectos de gran interés medioambiental (Di y Cameron, 2007).

Aunque algunos autores han observado una disminución en la digestibilidad de la MS, MO y PB (Fondevila et al., 1994; Ben Salem y Nefzaoui, 2003; Denek y Can 2006; Ben Salem y Smith, 2008; Mirzaei-Aghsaghali y Maheri-Sis, 2008; Ventura et al., 2009; Ben Salem, 2010; Abbeddou, et al. 2011a) en animales alimentados con dietas que incluían subproductos procedentes del olivar o del tomate, en forma de ensilado, bloques multinutrientes o suministrados directamente, y otros no han encontrado tales diferencias (Molina Alcaide et al., 2010a). Sin embargo, la utilización de subproductos como el alperujo y la pulpa de tomate promueven una mayor digestibilidad de la fibra y grasa de la dieta, sin modificaciones significativas de su EM (INRA, 1988; Molina Alcaide et al., 2010a; Abbeddou et al., 2011a). En cuanto a los efectos de la inclusión de subproductos en las dietas de rumiantes sobre el metabolismo del nitrógeno y su excreción, se ha observado una reducción en la excreción de N en orina, sin cambios aparentes en la retención de N (Abbeddou et al., 2011a; Greenwood et al., 2012), aunque algunos autores no han observado tales diferencias (Ben Salem y Znaidi, 2008; Molina Alcaide et al., 2010a). La inclusión de subproductos derivados del tomate en la dieta del rumiante promueve un mayor flujo y eficiencia en la síntesis de proteína microbiana (Ben Salem y Znaidi 2008; Abbeddou et al., 2011a). Existen ciertas discrepancias en la bibliografía en cuanto al efecto de la inclusión de subproductos en la dieta sobre la concentración de AGVs en el rumen. Todas las diferencias encontradas pueden deberse a factores tales como el tipo de subproducto utilizado, la formulación de la dieta en la que se incluyen y su interacción con otros ingredientes de la misma, la forma de presentación, la especie animal y su estado fisiológico.

2.2.3.2. Efecto sobre la producción de leche y su composición

La leche es producida por las hembras de los mamíferos para satisfacer los requerimientos nutricionales de sus crías durante la lactancia. Por ello, también constituye para las personas una fuente importante de energía, proteína de buena calidad, vitaminas y minerales. La leche tiene un reconocido valor como fuente natural de aminoácidos, como la carnitina y la taurina, y péptidos bioactivos con propiedades antitrombóticas, antihipertensivas, y antimicrobianas (Park et al., 2007). Sin embargo, el papel de la grasa de la leche en la salud del consumidor puede ser objeto de controversia (Elwood et al., 2008; Lock et al., 2008). De hecho, y a pesar de la presencia de lípidos con carácter beneficioso para la salud, como el butirato, ácidos grasos ramificados, ácido linoleico conjugado (CLA), ácido vacénico (*trans*-11, 18:1) y la esfingomielina (Shingfield et al., 2008), todavía algunos profesionales en nutrición humana consideran esencialmente la importante contribución de la leche a la ingesta diaria de ácidos grasos saturados, con efectos no precisamente saludables (WHO, 2003).

Cualquier cambio en la dieta de una cabra durante el periodo de lactación puede promover cambios en la composición y producción de la leche. Por ello, resulta especialmente importante prestar especial atención a la formulación de las dietas cuando se incluyen fuentes de nutrientes alternativas como los subproductos agroindustriales, evitando la presencia de posibles factores antinutricionales (Vasta et al., 2008), teniendo en cuenta que se mejore o al menos no se perjudique, *i*) la producción de leche (Aguilera et al., 1990), *ii*) el procesado y elaboración de sus productos derivados, *iii*) su valor nutricional y características nutracéuticas (Jenkins y McGuire, 2006). La calidad nutricional de los subproductos es importante para conseguir una mayor producción de leche y de mejor calidad (Vasta et al., 2008). Así, Dung et al. (2005), observaron un aumento progresivo en la producción de leche en cabras alimentadas con dietas en las que se sustituyó progresivamente paja de arroz por hojas de mandioca. También hay que tener en cuenta los efectos tecnológicos derivados de cualquier modificación en el perfil de ácidos grasos de la leche, ya que la leche de cabra se destina prácticamente en su totalidad a la fabricación de queso. No obstante, parece que en otras hembras rumiantes el procesado de la leche no afecta al contenido de ácido ruménico (Coakley et al., 2007), y el enriquecimiento de la leche en ácidos grasos *omega-3* no altera ni la producción (Zhang et al., 2006) ni las cualidades sensoriales del queso (Luna et al., 2008). La utilización de subproductos en alimentación de rumiantes puede afectar negativamente a

Capítulo 2

la producción de leche debido a la presencia de componentes bioactivos como los taninos (Makkar, 2003; Min et al., 2003). Sin embargo, se ha demostrado que una ingesta moderada de taninos puede tener efectos beneficiosos sobre la cantidad y calidad de la leche producida (Leiber et al., 2005; Vasta et al., 2008). Otros autores (Wang et al., 1996; Barry y McNabb, 1999) no han encontrado diferencias en la producción y composición de la leche de animales alimentados con dietas que contenían subproductos con bajas cantidades de taninos aunque sí un incremento del flujo de proteína al abomaso y de la absorción de aminoácidos esenciales en el intestino.

Los efectos de la inclusión de alimentos no convencionales sobre la calidad de la leche se pueden evaluar a través de las propiedades tecnológicas de la leche, que a su vez están íntimamente relacionadas con el contenido en grasa y proteína de la leche así como con el recuento de células somáticas. En este aspecto hay que tener siempre en cuenta el efecto de dilución de los componentes de la leche en los estadios de lactación con mayor producción de leche (Emery, 1988).

Numerosos trabajos indican que la dieta del animal afecta significativamente al perfil en ácidos grasos de la leche (Chilliard et al., 2000; Chouinard et al., 2001), así como a sus propiedades organolépticas (Urbach, 1990; Bendall, 2001). En la revisión realizada por Jenkins y McGuire en el año 2006 acerca de las estrategias desarrolladas en los últimos 25 años para modificar la composición química de la leche en rumiantes, cabe destacar que el tipo y la composición en aminoácidos de la proteína de la dieta pueden modificar el contenido en proteína de la leche, aunque se trate de un parámetro muy estable. No obstante, la glándula mamaria tiene la capacidad de modificar la composición en proteína de la leche en función de la concentración en aminoácidos de la sangre, el flujo de sangre a la mama y su actividad metabólica. Además, la producción de proteína en la leche depende, en gran medida, de la fracción de proteína fácilmente degradable en el rumen y también, aunque en menor medida, de la fracción no degradada (Sanz Sampelayo et al., 1999). Al igual que ocurre con las fuentes comunes de proteínas, el éxito de la utilización de otras fuentes alternativas en la alimentación de pequeños rumiantes en lactación depende de la habilidad para formular dietas balanceadas en proteína degradable y aminoácidos esenciales. De hecho, aquellos trabajos que han estudiado la inclusión de fuentes de nutrientes alternativas en la dieta de rumiantes, han encontrado discrepancias en cuanto a la concentración de proteína en la leche, habiéndose observado tanto una disminución (Cabiddu et al., 2004; Todaro et

al., 2004; Volanis et al., 2004; Abbeddou et al., 2011b), como una ausencia de cambios en la misma (Fegeros et al., 1995; Weiss et al., 1997; Hadjipanayiotou, 1999; Di Francia et al., 2004; Tsiplakou y Zervas, 2008; Molina-Alcaide et al., 2010a; Romano et al., 2010; Modaresi et al., 2011). Sin embargo, la concentración de grasa en la leche aumentó (Hadjipanayiotou, 1999; Volanis et al., 2004; Modaresi et al., 2011) o se mantuvo (Fegeros et al., 1995; Weiss et al., 1997; Di Francia et al., 2004; Todaro et al., 2004; Tsiplakou y Zervas, 2008; Molina-Alcaide et al., 2010a; Romano et al., 2010; Abbeddou et al., 2011b). La grasa de la leche es el componente más sensible a las modificaciones que se realicen en la dieta del animal (Jenkins and McGuire, 2006). También hay que tener en cuenta que las modificaciones en la fracción grasa de la leche de cabra dependen en gran medida del estadio de la lactación en que se encuentre el animal, siendo más acentuados los cambios en el último tercio de lactación (Mir et al., 1999; Rapetti et al., 2002; Bernard et al., 2005). La cantidad mínima de grasa en la dieta de cabras lecheras se ha estimado en 1 g/kg PV (Morand-Fehr y Sauvant, 1980) habiéndose observado que cantidades inferiores reducen la producción de leche y su contenido en grasa (Bender y Maynard, 1932; Delage y Morand-Fehr, 1967). En cuanto al contenido en lactosa de la leche parece que no es susceptible a cambios en la dieta, habiéndose encontrado sólo algunos trabajos en vacuno que hayan conseguido reducir el contenido en lactosa (Jenkins y McGuire, 2006). Sin embargo, aunque estas reducciones en el contenido de lactosa fueron estadísticamente significativas, sus valores nunca estuvieron por debajo de niveles fisiológicos normales. Solo algunos estudios han evaluado en pequeños rumiantes en lactación la utilización de subproductos agroindustriales, tales como el alperujo (Hadjipanayiotou, 1999; Cabiddu et al., 2004; Molina-Alcaide et al., 2010a), las pulpas de cítricos (Fegeros et al., 1995; Todaro et al., 2004; Volanis et al., 2004), el orujo de uva (Tsiplakou y Zervas, 2008), la pulpa de granada (Modaresi et al., 2011) y pulpa de tomate (Weiss et al., 1997; Di Francia et al., 2004; Romano et al., 2010; Abbeddou et al., 2011b). En ninguno de los trabajos citados anteriormente se ha observado un aumento en la cantidad de leche producida o en su concentración en proteína, ni disminuciones en su concentración en grasa. Algunos autores han observado una disminución de la cantidad de leche producida en animales cuya dieta incluía subproductos (Cabiddu et al., 2004; Volanis et al., 2004; Molina-Alcaide et al., 2010a), mientras que otros no han observado cambios (Fegeros et al., 1995; Weiss et al., 1997; Hadjipanayiotou, 1999; Di Francia et al., 2004; Tsiplakou y Zervas, 2008; Romano et al., 2010; Abbeddou et al., 2011b; Modaresi et al., 2011).

Capítulo 2

2.2.3.2.1. Efecto sobre el perfil en ácidos grasos de la leche

Los lípidos que contienen los alimentos que recibe el rumiante sufren importantes transformaciones en el rumen debidas a los procesos de lipólisis y biohidrogenación. El primero se refiere a la transformación hidrolítica de los ácidos grasos esterificados de la dieta en triglicéridos, glicolípidos y fosfolípidos. La biohidrogenación implica la reducción de los dobles enlaces existentes en los ácidos grasos liberados. Los ácidos grasos saturados liberados no sufren modificaciones en el rumen pero los insaturados son rápidamente hidrogenados por los microorganismos del rumen. Los principales sustratos para la biohidrogenación, presentes en los alimentos de los rumiantes, son los ácidos linoleico (**LA**) y linolénico (**LNA**) (Doreau y Ferlay, 1994). El proceso de biohidrogenación de los ácidos grasos insaturados de 18 carbonos conduce a la formación de ácido esteárico. Los factores que determinan la eficacia de la biohidrogenación son diversos. En primer lugar, la isomerización previa a la biohidrogenación, que requiere que el grupo carboxilo de la molécula esté libre, lo que determina que la lipólisis pueda considerarse como la etapa limitante del proceso global y que todos los factores que influyen en la lipólisis afecten también a la biohidrogenación (Bauman et al., 2003; Martínez, 2011). En general, se considera que aquellas características de la dieta que reducen el pH ruminal a valores inferiores a 6,25 afectan negativamente a la eficacia de la biohidrogenación (Sauvant et al., 1999). Otros factores que afectan negativamente a la eficacia de la biohidrogenación son la elevada concentración de ácidos linoleico (Atkinson et al., 2006; Harvatine y Allen, 2006) y linolenico (Troegeler-Meynadier et al., 2006) en la dieta. La composición en ácidos grasos de la leche de los rumiantes depende, por tanto, de una serie de factores intrínsecos (especie, raza, genotipo y estado fisiológico) y extrínsecos (manejo, ambientales y nutritivos), viéndose modificada cuando alguno de estos factores se modifica (Lock and Bauman, 2004; Dewhurst et al., 2006; Pulina et al., 2006; Chilliard et al., 2007; Sanz Sampelayo et al., 2007). Puesto que la biohidrogenación es un proceso que tiene lugar en el rumen, como respuesta de ciertos microorganismos a la toxicidad de los ácidos grasos poliinsaturados (Maia et al., 2007), es importante profundizar en el conocimiento de los mecanismos de acción y de los microorganismos implicados en este proceso para establecer estrategias que permitan mejorar la calidad de los productos derivados de los rumiantes (Paillard et al., 2007; Wallace et al., 2007; Kim et al., 2008).

La inclusión de subproductos agroindustriales en la dieta del rumiante puede modificar el perfil en ácidos grasos de la leche en función del nivel en que se incluyan en la dieta, de su composición y de la calidad de los nutrientes que contengan. La presencia de compuestos secundarios como los taninos, en esos subproductos, puede modificar positiva o negativamente el perfil en ácidos grasos de la leche (Leiber et al., 2005; Vasta et al., 2008).

En ovejas con subproductos del olivar se ha observado un incremento del contenido en ácidos grasos monoinsaturados (20%) y oleico (25%), y una reducción en los ácidos grasos saturados (3%) y de cadena media y corta (Chiofalo et al., 2004; Abbeddou, et al., 2011b). Además, Molina-Alcaide et al. (2010a) encontraron en cabras Murciano-Granadina suplementadas con bloques multinutrientes que incluían alperujo, una disminución en la producción de leche pero acompañada de una mejora en el perfil de ácidos grasos que hacía más saludable la grasa mientras que Tsiplakou y Zervas. (2008) observaron, en cabras alimentadas con hojas de olivo, un aumento en ácidos grasos poliinsaturados y esteárico. En cuanto a los subproductos de la industria del vino, el orujo de uva parece aumentar la concentración total de poliinsaturados y esteárico en ovejas, pero al mismo tiempo no produce ningún cambio en el perfil graso en cabras (Tsiplakou y Zervas, 2008). Modaresi et al. (2011) evaluaron en cabras la inclusión de pulpa de granada en la dieta, observando un aumento de las concentraciones en ácidos vaccénico, punícico, LNA y CLA en la leche. Los estudios que han evaluado los efectos de la utilización de subproductos de la industria del tomate en leche, se han realizado sólo en ovejas (Romano et al., 2010; Abbeddou et al., 2011b). En el trabajo de Romano et al. (2010) se observó un incremento del contenido en CLA (20%) y de ácidos grasos poliinsaturados (6,5%) en la leche, mientras que Abbeddou et al. (2011b) observaron una reducción en ácidos grasos de cadena media y corta, acompañada de un aumento del contenido en ácido oleico.

2.2.3.2.2. Relación entre los ácidos grasos y las cualidades saludables de la leche

Los cambios sociales y de hábitos alimenticios y estilo de vida, producidos en los últimos años, han suscitado cambios en el estado nutricional y la salud humana. Se observa una creciente incidencia de enfermedades crónicas como la obesidad, diabetes, enfermedades cardiovasculares y algunos tipos de cáncer, asociadas a la dieta (WHO, 2003). El importante papel de la dieta en la prevención de estas enfermedades ha

Capítulo 2

derivado en un gran interés por los alimentos funcionales a los que se atribuyen propiedades beneficiosas para la salud, que ayudan a mejorar nuestra calidad de vida (Craig-Schmidt, 2006; Shingfield et al., 2008; Siró et al., 2008). Durante los últimos 20 años la atención de los investigadores en el área se ha centrado en aquellos ácidos grasos con posibles efectos beneficiosos o perjudiciales para la salud humana, fundamentalmente ácidos grasos saturados, *omega 3*, ruménico (CLA) y *trans* (Lawson et al., 2001; Pariza et al., 2001; Simopoulos, 2002; Kühlsen et al., 2005; Collomb et al., 2006; Parodi, 2009). Sin embargo, aproximadamente el 60% de la grasa de la leche es saturada (Jensen, 2002), lo que suscita un rechazo a su utilización y recomendación por parte de los especialistas en nutrición humana de no consumirla (Lock et al., 2008). No obstante, hay que considerar que los posibles efectos negativos derivados del consumo de ácidos grasos saturados pueden verse contrarrestados por la interacción con otros componentes de la dieta y de la propia leche (Lock et al., 2008; Parodi, 2009). A lo largo de los últimos años, numerosos estudios han demostrado la posibilidad de modificar de forma natural, mediante cambios en la dieta, la composición del perfil en ácidos grasos de la leche, haciéndola más saludable para el consumidor (Lock y Bauman, 2004; Pulina et al., 2006; Chilliard et al., 2007), aunque sólo algunos se han llevado a cabo en cabras (Bouattour et al., 2008; Luna et al., 2008; Bernard et al., 2009).

Existen diferencias en cuanto a la composición en ácidos grasos entre la leche de cabra, oveja y vaca (**Tabla 2.3**). No todos los ácidos grasos saturados presentes en la leche suponen un riesgo potencial para el desarrollo de enfermedades cardiovasculares (Lock et al., 2008; Parodi, 2009). Entre dichos ácidos grasos pueden considerarse el butírico, caproico, caprílico y cáprico (4:0, 6:0, 8:0, y 10:0), que al igual que otros ácidos grasos de cadena corta y media, proceden mayoritariamente de la síntesis *de novo*, que se produce en la glándula mamaria a partir del acetato y β -hidroxibutirato (Van Soest, 1994; Sanz Sampelayo et al., 2007). Al ácido butírico se le atribuye un efecto protector frente al cáncer de colon (Parodi, 1997, 1999), mientras que a los ácidos caproico, caprílico, y cáprico se les atribuyen propiedades beneficiosas, que ayudan en el tratamiento de determinados trastornos metabólicos (Babayan, 1981; Haenlein, 1992, 1996, 2001, 2004; García Unciti, 1996; Boza and Sanz Sampelayo, 1997; Chilliard and Lamberet, 2001; Park et al., 2007; Raynal-Ljutovac et al., 2008).

Tabla 2.3. Composición en ácidos grasos de la leche (g/100 g ácidos grasos totales) de cabra, oveja y vaca alimentadas con dietas similares.

	Oveja ^a	Cabra ^b	Vaca ^c
4:0	4,12	2,38	3,28
6:0	3,71	2,47	2,70
8:0	3,45	2,74	1,62
10:0	10,2	10,6	4,26
<i>cis</i> -9 10:1	0,42	0,27	0,43
12:0	5,10	5,72	5,14
14:0	10,2	12,1	12,8
<i>cis</i> -9 14:1	0,16	0,23	1,49
15:0	0,83	1,20	1,70
16:0	25,1	29,8	28,7
<i>cis</i> -9 16:1	1,41	0,78	1,81
17:0	0,58	0,57	0,79
18:0	6,23	4,88	5,77
<i>cis</i> -9 18:1	13,8	13,7	14,9
<i>trans</i> -10 18:1	0,84	0,44	2,96
<i>trans</i> -11 18:1	2,23	1,17	1,04
Total 18:1	19,3	16,9	21,1
<i>cis</i> -9, <i>cis</i> -12 18:2	2,87	2,41	2,96
Total 18:2 (no conjugado)	3,67	2,73	3,09
<i>cis</i> -9, <i>trans</i> -11 18:2	0,94	0,82	0,60
<i>trans</i> -10, <i>cis</i> -12 18:2	0,01	< 0,01	< 0,01
Total CLA	1,10	0,93	0,70
<i>cis</i> -9, <i>cis</i> -12, <i>cis</i> -15 18:3	0,46	0,19	0,09
Σ saturados	70,8	71,3	70,8
Σ monoinsaturados	22,5	22,4	25,1
Σ poliinsaturados	5,23	5,03	3,81
<i>cis</i> -9, <i>trans</i> -11 18:2/(<i>cis</i> -9, <i>trans</i> -11 18:2 + <i>trans</i> -11 18:1)	0,30	0,41	0,37

^aHervás et al. (2008); ^bBernard et al. (2009); ^cRoy et al. (2006).

La grasa de la leche es rica en CLA (60% de la ingesta diaria de CLA), especialmente el ácido rumenico (*cis*-9,*trans*-11, CLA) al que se atribuyen efectos beneficiosos para la salud como la prevención del cáncer, aterosclerosis, diabetes, infecciones bacterianas, favorecer la eliminación de radicales libres, mejorar el perfil en ácidos grasos y su metabolismo, efectos inmunomoduladores y osteosintéticos etc. (Ha et al., 1987; Jahreis et al., 1999; Parodi, 1999; Macdonald, 2000; Pariza et al., 2001; Yu et al., 2003; Sieber et al., 2004; Li y Watkins, 2006; Benjamin and Spener, 2009). Sin embargo, el isómero, *trans*-9, *trans*-11, CLA tiene un mayor efecto antiproliferativo y apoptótico que *cis*-9, *trans*-11 CLA (Shingfield et al., 2008). Mientras que algunos estudios han demostrado en animales, que una

Capítulo 2

dieta rica en CLA tiene efectos positivos sobre la salud del de animales mejorando el desarrollo y crecimiento y evitando la obesidad (Dhiman et al., 2000; Pariza et al., 2001), los resultados obtenidos en estudios realizados con humanos parecen contradictorios (Sailas y Spener, 2009). Por ejemplo, al isómero *trans*-10, *cis*-12 CLA se le han atribuido propiedades beneficiosas para la salud, pero parece que también puede inducir la aparición de cáncer de colon, esteatosis y resistencia a la insulina (Benjamin y Spener, 2009; Navarro et al., 2010).

De acuerdo con Williams (2000) y Givens (2005) el consumo de ácidos grasos saturados de cadena media aumenta el colesterol total y las lipoproteínas de baja densidad (LDL) en el consumidor, con el consiguiente riesgo de enfermedad cardiovascular. El consumo de ácidos grasos saturados y ácidos grasos poliinsaturados *omega*-6 ha de reducirse en beneficio de los ácidos grasos poliinsaturados *omega*-3, que poseen propiedades antitrombóticas, antiinflamatorias y beneficiosas para el desarrollo neuronal y funciones cognitivas (Salem et al., 2001; Lorigeril y Salen, 2004; Bourre, 2005; Caballero et al., 2006). Como consecuencia de sus propiedades cardiosaludables y antiinflamatorias numerosos trabajos (Lock y Bauman, 2004; Bourre, 2005) están orientados a aumentar el contenido en los alimentos de ácidos eicosapentanoico (EPA; 20:5n-3), docosahexaenoico (DHA; 22:6n-3) y α -linolénico (C18:3 n-3). El aporte en la dieta humana de EPA y DHA preformados es particularmente importante debido a que la eficiencia de la síntesis endógena a partir del LNA es baja y puede ser limitante en determinadas circunstancias como el embarazo o la lactancia (Burdge y Calder, 2005; Williams y Burdge, 2006). Por todo lo anterior, la relación *omega* 6/*omega* 3 o n-6/n-3 de la dieta es considerada un factor indicativo de su salubridad, asociándose valores inferiores a 4 con una reducción en la prevalencia de enfermedades crónicas asociadas a la dieta (Simopoulos, 2002).

Recientemente se ha cuestionado la salubridad del consumo de ácidos grasos con dobles enlaces en posición *trans* por el posible riesgo de enfermedad cardiovascular que conlleva (Gómez-Cortés et al., 2008, Hervás et al., 2008). En los últimos años, diferentes autores han mostrado la relevancia de dichos ácidos grasos por su actividad biológica sobre la salud humana (Jahreis et al., 2000; Martin y Valeille, 2002; Léger et al., 2007). El consumo de ácidos grasos *trans*, provenientes de la industria alimentaria, se ha asociado con enfermedades cardiovasculares, mientras

que los efectos derivados del consumo de productos lácteos parecen depender de la cantidad ingerida de los mismos (Mozaffarian et al., 2006; Chardigny et al., 2008; Motard-Bélanger et al., 2008). De hecho, la salubridad del consumo de ácidos grasos con dobles enlaces en posición *trans* se ha cuestionado por el posible riesgo de enfermedad cardiovascular que ello conlleva, aumentando los niveles de LDL y reduciendo los de lipoproteínas de alta densidad (HDL) (Mensink et al., 2003). A los ácidos *trans*-10, *cis*-12 18:2 y *trans*-10 18:1, se les atribuyen efectos proaterogénicos e inductor de patologías cardíacas, respectivamente (Risérus et al., 2004; Tricon et al., 2004; Roy et al., 2007). Sin embargo, al ácido vacénico (*trans*-11 18:1), que es el ácido graso *trans* más abundante en la leche, se le atribuyen propiedades anticancerígenas (Smith et al., 2009; Tyburczy et al., 2009).

2.3. ESTUDIO DE LA MICROBIOTA RUMINAL

Al conjunto de especies microbianas que conviven y constituyen un determinado ecosistema se les denomina comúnmente como “*microbioma*”. Así durante años se han realizado estudios de los distintos microbiomas presentes en distintos ambientes como el agua, el suelo, intestino delgado, colon, ciego, rumen, etc. Dentro de ellos, el ecosistema ruminal, caracterizado por la gran diversidad y densidad de microorganismos que alberga, ha sido objeto de un intenso estudio en los últimos 50 años (Hespell et al., 1997; Hobson y Stewart, 1997; Simpson et al., 2002). Tradicionalmente su estudio se ha llevado a cabo mediante la caracterización fenotípica (morfología, motilidad, sustratos degradados y productos resultantes), utilizando métodos clásicos de cultivos anaerobios selectivos (Hungate, 1966; Hobson y Stewart et al., 1997; Dehority et al., 1989, 2003). Las técnicas más empleadas para el conteo de microorganismos eran la siembra en tubos de cultivo anaerobios (Hungate, 1973) y la técnica del número más probable (NMP; Dehority et al., 1989). Para el estudio de la diversidad bacteriana, en muestras de contenido ruminal, se recurría a la determinación del perfil de fosfolípidos y ácidos grasos de la membrana celular bacteriana (Minato et al., 1988) o del contenido en G+C (Ogimoto y Imain, 1981). La identificación de especies microbianas se basaba en cultivos selectivos, tinciones, observaciones al microscopio o en el estudio de sus actividades metabólicas. Las limitaciones impuestas por los métodos tradicionales de cultivo para el estudio de la microbiota digestiva han sido mencionadas por numerosos autores y radican, fundamentalmente, en el desconocimiento de los factores de crecimiento y condiciones

Capítulo 2

ambientales que requieren la mayor parte de los microorganismos del tracto digestivo (Zoetendal et al., 2004; Firkins y Zu, 2006), así como la imposibilidad de contar aquellas células que, aunque pertenecen a especies cultivables, están en fase de división; errores debidos a la presencia de unidades formadoras de colonias iniciadas por conglomerados de células y no por células únicas; imposibilidad de hacer crecer todas las especies en un determinado medio de cultivo. Tal es así, que la mayor parte de las especies microbianas ruminales no han podido cultivarse (85 – 95 %, Krause y Russell, 1996; Hespell et al., 1997).

2.3.1. Técnicas moleculares basadas en el gen ARNr 16S

Actualmente se acepta que el mejor esquema de clasificación taxonómica debe reflejar las relaciones evolutivas naturales que existen entre organismos y que una clasificación basada únicamente en parámetros fenotípicos no es suficiente para alcanzar dicho objetivo (Raskin et al., 1997). La secuenciación de los ácidos nucleicos de los microorganismos es el método más preciso para su clasificación (Olsen et al., 1986). El empleo de técnicas moleculares en el estudio de los ecosistemas del tracto gastrointestinal, ha permitido ampliar el conocimiento de la diversidad y estructura de sus comunidades microbianas así como las dinámicas poblacionales asociadas a distintos factores (Amann et al., 1995; Rappe y Giovannoni, 2003). Los ácidos nucleicos, macromoléculas comunes a todos los seres vivos, cambian con el tiempo, considerándose como documentos de la historia evolutiva de los mismos (Zuckerandl y Pauling, 1965). Asumiendo que los cambios se producen al azar y que aumentan con el tiempo de manera lineal, las diferencias en la secuencia de nucleótidos presentes en dos organismos distintos, reflejan la distancia evolutiva existente entre ellos (Sarich y Wilson, 1967; Kimura, 1968). En la década de lo 60 se comenzó a especular acerca de la posibilidad de que determinadas macromoléculas pudieran emplearse para conocer la historia evolutiva de los microorganismos (Zuckerandl y Pauling, 1962, 1965). En este tipo de técnicas se emplean secuencias de ADN como marcadores moleculares. El gen codificante (*rss*) del ARN de la subunidad ribosómica pequeña o SSU (*Small SubUnit*) es la macromolécula más ampliamente utilizada en estudios de filogenia y taxonomía microbianas, el 16S para procariontes (1.500 pb aproximadamente) y el 18S para eucariotes, causando un profundo impacto en la visión de la evolución y, como consecuencia, en la clasificación e identificación microbiana. Su empleo, como cronómetro molecular, fue iniciado por el grupo de Carl Woese, en la Universidad de

Illinois (Urbana-Champaign), para la clasificación general de los organismos procariotas (Woese y Fox, 1977; Woese et al., 1990; Pace, 1997).

Varios estudios han demostrado que más del 90% de los microorganismos, que se observan mediante microscopía *in situ*, pueden extraerse y analizarse utilizando, como marcador bacteriano, el gen que codifica el ARNr 16S (Steffan y Atlas, 1991; Edwards et al., 2004), en comparación con los que pueden ser cultivados, que representan menos del 0,1% (Hill et al., 2000).

A pesar de que el ADN ribosómico 16S es el marcador de uso más generalizado, presenta ciertos inconvenientes como la variabilidad en el número de copias del mismo en diferentes especies (entre 1-15 copias según el organismo; Smith y Osborn, 2009) o, la dificultad para diferenciar especies muy similares genéticamente (Kim et al., 2003). Afortunadamente, las principales bacterias celulolíticas del rumen presentan 3 copias del 16S, lo cual permite la comparación de sus poblaciones (Tajima et al., 2001; Frey et al., 2006). Aunque existen cronómetros moleculares alternativos al ARNr 16S, como el gen de la región IRS1 o genes no relacionados con la síntesis de proteínas, hasta el momento ninguno ha conseguido desplazarlo. Además, el gen ARNr 16S presenta una serie de características que lo hacen idóneo como reloj molecular: está presente en todos los organismos procariotas; se encuentra en el cromosoma bacteriano y no en elementos genéticos móviles (como pueden ser los plásmidos), lo que dificulta su transmisión horizontal; su elevada antigüedad y el alto grado de conservación de su secuencia, ya que codifica parte de la maquinaria de biosíntesis proteica, proceso esencial de mantenimiento de las células y que determina, también, que la presión selectiva haya incidido en menor grado sobre su secuencia; la coexistencia, en su secuencia, de regiones altamente conservadas y de regiones variables o hipervariables (Neef et al., 1990) (**Figura 2.10**), y la gran cantidad de información relativa al mismo, depositada en las bases de datos.

Capítulo 2

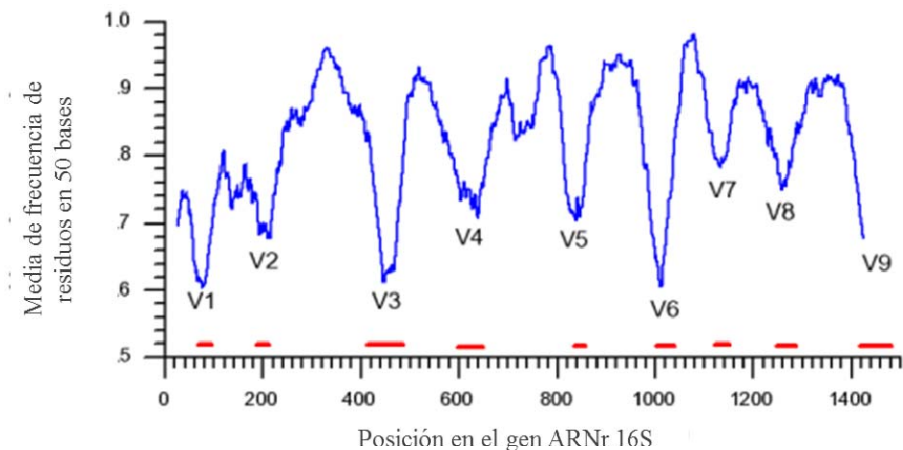


Figura.2.10. Regiones hipervariables en el gen ARNr 16S.

La aparición de regiones variables en el gen ARNr 16S se debe a las mutaciones neutras que han ido acumulándose lentamente en zonas que no afectan a la función de la molécula que aquel codifica, dando lugar a la aparición de oligonucleótidos denominados “*firma*” en la secuencia génica. Estos cambios, además, ocurren con suficiente lentitud como para permitir el rastreo de la historia evolutiva de un determinado linaje de seres vivos. La presencia de regiones conservadas en el gen ARNr 16S permite la reconstrucción de linajes mientras que las regiones variables (V1 a V9), definidas por la presencia de oligonucleótidos firma y presentes sólo en determinados taxones, permiten diferenciar especies. La variación de secuencias entre especies del mismo género oscila entre el 1,5 y el 3% (Snel et al., 1995). Además, el hecho de que las regiones hipervariables se encuentren limitadas por regiones conservadas, de secuencia conocida, permite el desarrollo de cebadores o “*primers*” específicos que hacen posible amplificar dicha zona mediante técnicas moleculares (Reacción en Cadena de la Polimerasa o **PCR**), para identificar y cuantificar microorganismos y estudiar su diversidad en el rumen.

2.3.2. Bases de datos

La producción científica mundial, referente a la secuenciación de genes y proteínas, está centralizada en bases de datos potentes que permiten realizar fácilmente búsquedas y alineaciones, simples o múltiples, de secuencias usando herramientas bioinformáticas diversas (Entrez, BLAST, ClustalW, etc.). Estas herramientas están disponibles en los portales web que mantienen las bases de datos. GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>; Benson et al., 2005) es una colección de secuencias nucleotídicas, dependiente del National Center for Biotechnology

Information (NCBI), incluida en una red mundial denominada INSDC (International Nucleotide Sequence Database Collaboration). La INSDC incluye, además, la base de datos de ADN de Japón o DDBJ (DNA Data Bank of Japan; <http://www.ddbj.nig.ac.jp/intro-e.html>; Tateno et al., 2005) y la del Laboratorio Europeo de Biología Molecular o EMBL (European Molecular Biology Laboratory; Kanz et al, 2005), conocida como “*Nucleotide Database*”. Estas organizaciones reciben e intercambian secuencias genéticas producidas en laboratorios de todo el mundo, procedentes de más de 100.000 organismos distintos. El RDP II (Ribosomal Database Project II; <http://rdp.cme.msu.edu/>; Cole et al., 2005) es otra base de datos de secuencias, desarrollada por investigadores de la Universidad de Michigan, en Estados Unidos, que contiene información de genes ribosómicos de la SSU (*Small SubUnit*) y la LSU (*Large SubUnit*), de procariotas, eucariotas y orgánulos celulares (Cole et al., 2009).

2.3.3. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La PCR es la base de la mayor parte de las técnicas independientes de cultivos que permite amplificar genes diana utilizando oligonucleótidos iniciadores o cebadores (*primers*), diseñados para unirse tanto a secuencias específicas como a aquellas que abarcan un amplio rango de especies microbianas, y examinar directamente la diversidad y la estructura de las comunidades del rumen, en función de su genotipo y no del fenotipo. En la **Figura 2.11**, se muestra un esquema ilustrativo de los ciclos que forman parte de esta reacción, que incluyen una fase de desnaturalización, otra de alineamiento y una última de elongación. Aunque se trata de una técnica extremadamente útil, la PCR presenta ciertas limitaciones tales como la inhibición de la amplificación, amplificación diferencial y formación de artefactos como las quimeras. Además, investigaciones recientes han puesto de manifiesto que la eficiencia de amplificación para los microorganismos más abundantes es elevada, mientras que para los que representan una fracción reducida es muy baja (González et al., 2012). De ahí la importancia de conocer el riesgo de los sesgos introducidos en la detección y cuantificación de secuencias amplificadas, mientras se continúe utilizando la amplificación por PCR o hasta que llegue una tercera generación de métodos de secuenciación.

Capítulo 2

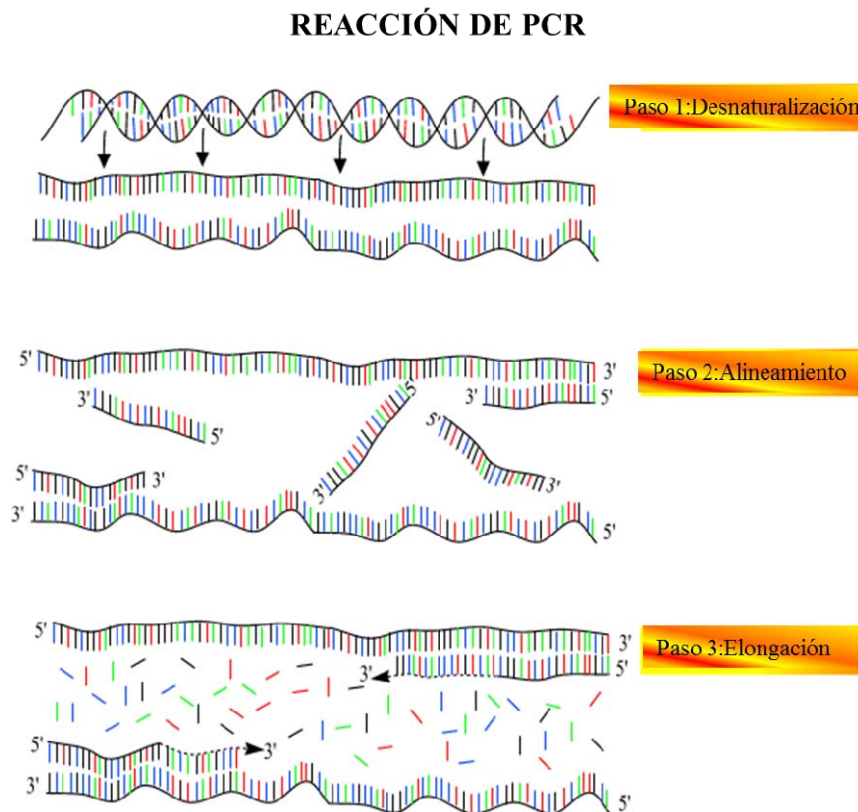


Figura 2.11. Esquema representativo de las reacciones que tienen lugar en un ciclo de PCR.

2.3.3.1. Cuantificación de grupos microbianos: PCR en tiempo real

La técnica de PCR en tiempo real (**qPCR**) se basa en la detección de la fluorescencia emitida por las cadenas de ADN, que se van formando en el proceso de amplificación *in vitro*. Para ello se utiliza una molécula simple (fluorocromo) o compleja (sonda de ADN), capaz de emitir fluorescencia tras unirse al ADN de cadena doble y, un detector de fluorescencia, que monitoriza, ciclo a ciclo de amplificación, el aumento exponencial en el número de cadenas de ADN. En los ensayos de este trabajo de Tesis, la molécula señalizadora empleada fue SYBR Green I. La qPCR consta de las mismas etapas que tienen lugar en una PCR convencional pero, además, en cada ciclo de amplificación, tras la fase de elongación de las cadenas, se programa un paso extra de detección de la fluorescencia emitida por la molécula que se une a las cadenas de ADN. El software del detector de fluorescencia genera una gráfica que relaciona el ciclo de amplificación con la fluorescencia emitida por SYBR Green I. El cálculo de las copias de una secuencia determinada se hace relacionando la fluorescencia emitida por las dobles cadenas de ADN con una variable denominada “ciclo umbral” (C_T). El C_T es el ciclo de amplificación en el que el nivel de fluorescencia emitida está claramente por encima del

ruido electrónico generado por la autofluorescencia del fluoróforo sin unir al ADN, es decir, el ciclo que indica que se ha alcanzado un umbral de fluorescencia (Threshold). El C_T es un parámetro que depende de diversos factores, siendo el principal la cantidad de ADN molde presente en la muestra que se ha cargado en el sistema. El valor de C_T también puede verse afectado por la especie bacteriana estudiada (Firkins y Yu, 2006), por la presencia de inhibidores en la muestra, que ralenticen el proceso de amplificación, o por la formación de dímeros de cebadores durante el proceso. Existe una relación lineal inversa entre el C_T y la cantidad de ADN molde presente al inicio de la reacción. En esta relación reside el fundamento de la técnica. La cuantificación se puede realizar de forma absoluta, si se emplean diluciones seriadas de ADN estándar, de concentración conocida, para construir una recta patrón a partir de la cual interpolar la cantidad de ADN presente en las muestras problema. Puede recurrirse también a un método alternativo de cuantificación sin recta patrón, relativizando los valores de C_T encontrados para la secuencia de interés, con respecto a los valores de C_T encontrados para un gen de expresión constitutiva. Para este tipo de cuantificación existen diversas modalidades de cálculo (Pfaffl, 2001; Denman y McSweeney, 2005). En el caso de muestras del contenido ruminal, que presentan una alta concentración de materia orgánica (material vegetal y otros restos de alimentos), la obtención de una muestra de ADN con una alta pureza así como la cuantificación absoluta de las poblaciones microbianas pueden resultar complicadas, por lo que es de gran utilidad la relativización de las abundancias microbianas (Stevenson y Weimer, 2007).

El análisis de las curvas de disociación se debe realizar rutinariamente, tras los ciclos de amplificación, para evaluar la pureza del amplicón formado en cada reacción. Las curvas de disociación monitorean la pérdida de fluorescencia, cuando la temperatura se incrementa paulatinamente hasta un máximo en el que todas las dobles hebras, específicas o no, se hayan disociado liberando, por tanto, el SYBR Green I contenido. Cualquier producto amplificado, no deseado, será detectado durante este análisis al dar lugar a una curva con varios picos de disociación. Sin embargo, la presencia de distintas especies en un mismo grupo de microorganismos (eg: metanogénicas), puede dar lugar a la aparición de distintos picos en la curva de disociación sin que exista una contaminación de la muestra (Hays et al., 2011).

Capítulo 2

2.3.4. Estudio de la biodiversidad digestiva: secuenciación de nueva generación

Como se ha mencionado anteriormente, la clasificación taxonómica de microorganismos ha de reflejar las relaciones evolutivas naturales que existen entre ellos (Raskin et al., 1997). Por esta razón actualmente tienen un especial protagonismo las técnicas basadas en la amplificación y secuenciación del gen ARNr 16S. Desde que Frederick Sanger y Walter Gilbert (Gilbert y Maxam, 1973; Sanger, 1975; Sanger y Coulson, 1975) comenzaran a secuenciar, combinando técnicas de fragmentación o terminación de cadenas con la separación de fragmentos de distinto tamaño o “*bandas*” por electroforesis, ha existido un gran interés en incrementar el rendimiento de las técnicas de secuenciación. A lo largo de los años se han realizado numerosas propuestas para reemplazar tanto a la secuenciación Sanger como a la secuenciación por hibridación (Khrapko et al., 1989), captación directa de imágenes de secuencias de ADN mediante microscopio de fuerza atómica (Hansma et al., 1991), detección de espectros de masas (Koster et al., 1996), aplicación de microfluidos (Woolley y Mathies, 1995), así como numerosos métodos de secuenciación por síntesis (Melamede, 1985; Hyman et al., 1988; Koster et al., 1991; Nyren et al., 1993; Brenner et al., 2000). Sin embargo, la diferencia y el progreso lo han marcado tres mejoras revolucionarias, conseguidas durante el estudio del genoma humano (Cantor y Smith, 1999):

- Sustitución de marcadores radioactivos por marcadores fluorescentes para detectar fragmentos terminales
- El uso de electroforesis capilar
- El desarrollo de protocolos de secuenciación mejorados

Todo esto, combinado con el desarrollo de la tecnología y la robótica, ha permitido avanzar desde la preparación de librerías, mediante crecimiento de colonias bacterianas en las que se introducían plásmidos vectores, hasta el uso de placas multipocillo de tamaño microscópico que no requieren cultivos bacterianos y reducen el coste (*Ley de Moore*; Moore, 1965) y el tiempo necesario para la preparación de las muestras (Meldrum, 2000). Otra ventaja asociada a las nuevas metodologías es el gran número de secuencias que permiten obtener y que evitan los problemas derivados del uso de cultivos bacterianos como la transferencia horizontal de plásmidos y vectores entre bacterias, o la imposibilidad de detectar las especies poco abundantes (Dunbar et al., 2002) que generan errores en los análisis de diversidad. Todo ello ha revolucionado la investigación biológica, creando un mercado que ha dado lugar al desarrollo

de plataformas interesadas en mejorar continuamente las prestaciones de los productos y servicios ofertados (454 Life Science, Illumina, Applied Biosystems, Pacific Biosciences, Helicos Bioscience, etc.). El impacto de esas plataformas en genómica ha revolucionado también la naturaleza de la experimentación en genética. El elevado rendimiento de las técnicas actuales de secuenciación las hace idóneas para el estudio de hábitats tan complejos como el ecosistema ruminal. No obstante, tanto el elevado costo de los aparatos como la necesidad de equipos de computación potentes y de personal especializado suponen una limitación para su implantación (Mardis, 2008a y b; Rothberg y Leamon, 2008). Los aparatos de secuenciación de última generación (Roche 454 GS FLX Sequencer, Illumina Genome AnalyzerIIx, Life Technologies SOLiDTM Sequencer, entre otros) son capaces de generar millones de secuencias génicas, procedentes de colecciones de fragmentos que no requieren su previa clonación en vectores génicos (**Figura 2.12**). Cada uno de estos aparatos tiene sus ventajas y limitaciones, aunque están en continuo desarrollo. Así, Titanium 454 GS FLX puede generar hasta 1 millón de secuencias (shotgun) o 700.000 (amplicones) de entre 450-600 pares de bases en un único análisis, de unas 10 horas de duración, con una fidelidad del 99,995% (<http://454.com/products/gs-flx-system/index.asp>). Illumina puede generar una mayor cantidad de secuencias (100 millones), pero de menor longitud (100-200 pb) y en un sólo análisis (48-72 horas), siendo este último tipo de análisis más caro. Estas características determinan la elección de una plataforma u otra, o incluso de las dos, en función de los objetivos del estudio a realizar. Como ejemplo de la combinación de ambas, puede citarse el estudio de la diversidad microbiana y su potencial metabólico realizado con osos panda (Zhu et al., 2011) en el que se ha utilizado 454 GS FLX titanium e Illumina para cada uno de los análisis, respectivamente.

Entre las aplicaciones del 454 GS FLX titanium se incluyen: la secuenciación del genoma completo, captura de secuencias, metagenómica y secuenciación de transcriptomas y de amplicones. En el presente trabajo se ha utilizado el secuenciador 454 GS FLX titanium para el análisis de secuencia de amplicones de regiones hipervariables (V1-V3) del gen ARNr 16S de archaeas metanogénicas en muestras procedentes del rumen de cabras tanto no productivas como en lactación. Es requisito imprescindible, para llevar a cabo estudios de diversidad microbiana con este tipo de sistemas, seguir una serie de pasos en el procesado de las muestras (Mardis, 2008a, b; Rothberg y Leamon, 2008), como la construcción de librerías; PCR en emulsión; y pirosecuenciación y lectura de secuencias, que están resumidos en la **Figura 2.12** y que se detallaran en el **apartado 3.5.3** del capítulo de material y métodos. El funcionamiento del secuenciador de Roche 454 GS FLX titanium está basado en la “*pirosecuenciación*”. Es

Capítulo 2

decir, cada vez que la ADN polimerasa incorpora un nucleótido a la secuencia se libera una molécula de pirofosfato, iniciándose una serie de reacciones en cadena que culminan con la emisión de luz, al liberarse oxiluciferina por acción de la luciferasa (**Figura 2.12**). Se recogen las imágenes generadas por la luz emitida como consecuencia de la incorporación de nucleótidos, siendo la cantidad de luz emitida directamente proporcional a la cantidad incorporada de un determinado nucleótido. Finalmente, las señales de luz recogidas se transforman en la secuencia correspondiente y se analizan para eliminar posibles errores y secuencias de mala calidad. En este paso radican algunos de los inconvenientes de este sistema, ya que la lectura de homopolímeros (regiones de la secuencia con un número repetido del mismo nucleótido consecutivo) puede dar lugar a errores como consecuencia de la saturación de la lente.

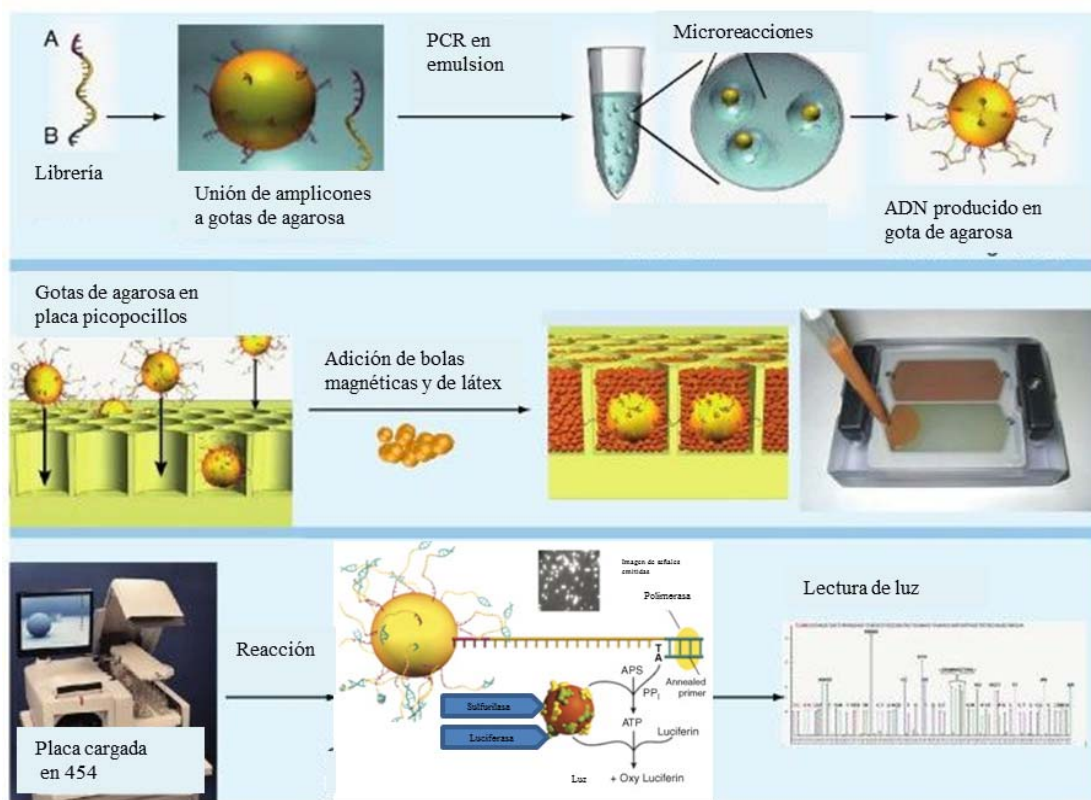


Figura. 2.12. Esquema de preparación de muestras y secuenciación en 454 GS FLX titanium.

2.3.5. Análisis bioinformático y limitaciones del mismo

La pirosecuenciación se utiliza como herramienta en estudios de genotipado desde los años 90 aunque, en sus inicios, no se consideraba su potencial debido a la corta longitud de las secuencias generadas (Rothberg y Leamon, 2008).

Los archivos generados en el 454 contienen las secuencias de las muestras. A partir de ellos y, gracias al uso de herramientas bioinformáticas, que permiten aplicar distintos algoritmos, es posible estudiar la diversidad de los microorganismos presentes en esa muestra y como se han visto afectados por los distintos factores ambientales o tratamientos experimentales. Se pueden usar distintos programas online; algunos permiten un análisis completo de la diversidad de los microorganismos (MOTHUR, QIIME, CD-HIT-OTU, etc.); otros, sin embargo, ejecutan comandos específicos para determinadas acciones (BELLOPHORON, NAST, MEGA4, PHYLIP, DOTUR, BLAST, LUCY, etc.). Un paso previo importante antes de analizar las secuencias es eliminar o corregir, si es posible, todas aquellas secuencias anómalas que puedan generar errores en el análisis de diversidad. Las secuencias anómalas pueden deberse a errores analíticos del secuenciador (homopolímeros y fallos de lectura; LUCY) o a fallos derivados de la preparación de la librería (secuencias cortas y quimeras; BELLOPHORON). A continuación, se procede a identificar el tratamiento experimental al que corresponden las secuencias obtenidas mediante los denominados “*códigos de barras*” y se corrobora que la cantidad de secuencias obtenidas es similar para los distintos tratamientos experimentales. A continuación, los pasos a seguir en cualquier estudio de diversidad microbiana generalmente son los mismos e incluyen: *i*) identificación taxonómica de las secuencias, comparando con las existentes en las bases de datos (GenBank; RDP II; Greengenes; SILVA); *ii*) clasificación de las secuencias en unidades taxonómicas operacionales (OTU; Stackebrandt y Goebel 1994; Edwards et al., 2004), llegando al nivel de especie cuando la similitud entre ellas es superior a 96-98% y considerándose “*desconocidas*” aquellas secuencias que compartan menos de un 50-60% de similitud con las existentes en la base correspondiente; *iii*) representación de la información obtenida en forma de árboles filogenéticos, que muestran las distancias evolutivas de los microorganismos estudiados, y en los que las secuencias del gen ARNr 16S, que comparten más de un 96 - 98% de similitud, se agrupan en un mismo OTU.

2.3.6. Inconvenientes y errores comunes asociados a la pirosecuenciación

En estudios de diversidad microbiana, hay que tener especial cuidado con numerosos factores, que pueden inducir a errores en la obtención e interpretación de los resultados obtenidos. Estos factores suelen dar lugar, fundamentalmente, a la sobreestimación o subestimación de la diversidad microbiana (Kim et al., 2010; Kumar et al., 2011).

Capítulo 2

En primer lugar es necesario realizar una adecuada selección o diseño de los *primers* a utilizar y de la región a amplificar del gen ARNr 16S. Existen diversos programas que permiten una adecuada selección y elaboración de primers, como Primer Sequence Prevalence o Probe Match, entre otros. Las regiones del gen ARNr 16S a utilizar para llevar a cabo el screening de una comunidad bacteriana determinada, varían en función del objetivo del estudio (Yang et al., 2006). En un metanálisis realizado por Kim et al. (2010) en el que compararon diferentes primers y regiones del gen ARNr 16S de bacterias y arqueas del rumen, recomendaron la utilización de las regiones V1-V3 o V4-V7 para estudios de diversidad de arqueas usando 454 GS FLX titanium, agrupando los OTUs con un 97 o 98% de similitud, respectivamente. También estos autores recomendaron la utilización de las regiones V1-V4 para estudios de diversidad de bacterias usando 454 GS FLX titanium y agrupando OTUs con un 96% de similitud.

Especial atención requieren los errores derivados de la PCR, aunque algunos de ellos son inherentes a la propia técnica como una menor eficiencia en la amplificación de las especies menos abundantes (Gonzalez et al., 2012). Otros errores derivados de la PCR son la contaminación de las muestras, amplificación de secuencias cortas y quimeras. Estos errores pueden evitarse utilizando una polimerasa de alta fidelidad (iProof), protocolos de amplificación con un número de ciclos reducido (20-30 ciclos) y una adecuada selección de primers y regiones del gen ARNr 16S a amplificar.

Además, hay que considerar los errores derivados de la lectura de las secuencias durante la pirosecuenciación, como los que implican secuencias cortas o que presentan homopolímeros, que no suelen suponer más del 4% de las secuencias generadas, pero que pueden conducir a sobreestimaciones en la diversidad microbiana. Por ello, la mayoría de los autores (Kunin et al., 2010) recomiendan la utilización conjunta de dos medidas: un software (LUCY) que permita eliminar o corregir aquellos fallos de lectura de homopolímeros, y no agrupar OTUs por encima de un 97% de similitud. En cuanto a las secuencias cortas existe la posibilidad de excluirlas del análisis, estableciendo un tamaño mínimo durante el análisis con los programas MOTHUR o QIIME, entre otros.

Otro problema importante se debe a la presencia de quimeras, o secuencias que proceden de la fusión de las secuencias de dos microorganismos distintos y que, cuando se alinean con las bases de datos de referencia, se interpretan como pertenecientes a microorganismos nuevos (Hugenhotlz y Huber, 2003; Ashelford et al., 2005). Existen programas que

permiten detectar y eliminar las quimeras siendo BELLOPHORON el más utilizado. Además, gran cantidad de las quimeras procedentes de diversos trabajos se han incorporado a las bases de datos de uso común. Existe la posibilidad de descargar secuencias de las bases de datos y eliminar las quimeras presentes antes de utilizarlas para comparar las secuencias problema de un determinado estudio (Claesson et al., 2010), pero lo mejor es utilizar bases de datos de referencia que estén limpias de quimeras como es el caso de *Greengenes*.

2.3.7. Aplicaciones y futuro de las técnicas moleculares de nueva generación

Estas tecnologías son muy prometedoras para el conocimiento de la diversidad de microorganismos presentes en el rumen y de cómo podrían manipularse dichos microorganismos para mejorar la calidad de los productos derivados de rumiantes, la eficiencia productiva de este grupo de animales o reducir el impacto medioambiental asociado con sus sistemas de producción (Brulc et al., 2010). En los últimos años se han abordado numerosos estudios acerca de la diversidad microbiana del rumen usando técnicas moleculares, en vacas (Tajima et al., 1999, 2001; Wright et al., 2007), ciervos (Sundset et al., 2007, 2009), ovejas (Wright et al., 2004a, 2006; Yáñez et al., 2010), cabras (Shi et al., 2008; Cheng et al., 2009; Abecia et al., 2011; Cunha et al., 2011; Gu et al., 2011), yak (Yang et al., 2010a) y búfalos (Yang et al., 2010b).

Los avances derivados del uso de las tecnologías de secuenciación de nueva generación, han ampliado los horizontes del campo de la “*metagenómica*”, que permite secuenciar el ADN de las especies microbianas presentes en un determinado ambiente (*microbioma*) y estudiar su funcionalidad sin tener que recurrir a los clásicos sistemas de cultivo (Handelsman, 2004; Schloss, 2008). La combinación de las nuevas técnicas de secuenciación y *metagenómica* constituye una herramienta útil para responder a algunas de las preguntas que la humanidad se lleva haciendo desde el siglo XIX: cuáles son los microorganismos presentes en cada ecosistema, cuántos son y cuál es su función.

Los avances en la secuenciación han abierto las puertas a nuevas áreas de interés biológico, como la paleogenómica, evolución, ecología, epigenética, identificación de mutaciones, polimorfismo y nuevos agentes etiológicos de enfermedades, así como el descubrimiento de ARN no codificado (Mardis 2008a, b). La correlación de distintos tipos de análisis, como la metilación del genoma, patrones de unión de las histonas y expresión génica pueden ser la clave para desvelar los secretos que contienen los microorganismos y las células.

Capítulo 3
Material y métodos

Los resultados recogidos en las publicaciones que se incluyen en esta memoria de Tesis Doctoral corresponden a tres experimentos diferentes. Por ello, en el presente capítulo se describen los materiales y métodos empleados en cada uno de esos experimentos, o en todos. En este último caso no se realiza especificación relativa al experimento.

3.1. ANIMALES

En los tres experimentos se utilizan cabras de raza granadina ($39,4 \pm 5,39$ kg peso vivo medio), canuladas en el rumen (**experimentos 1 y 2**) o en lactación (**experimento 3**). Un mes antes del inicio de los experimentos los animales reciben tratamiento antiparasitario (Ivomec, Lab MSD AGVET) intramuscular y se adaptan a las condiciones de confinamiento en jaulas metabólicas y cámaras de respirometría antes del comienzo de los ensayos, para evitar comportamientos anómalos, que pudieran influir en la ingesta de las dietas. El manejo de los animales y los procedimientos experimentales se llevan a cabo por personal cualificado, siguiendo las instrucciones del Real Decreto 1201/2005 relativo a la protección de los animales destinados a fines experimentales, en línea con las directrices marcadas en la Convención Europea para la Protección de los Animales Vertebrados usados en Experimentación y otros Propósitos de interés Científico (Directiva Europea 86/609).

La extracción del contenido del rumen se realizó a través de la cánula y con la ayuda de un tubo de PVC de 1,5 cm de diámetro, cuyo extremo distal se coloca en el saco ventral del rumen y al que se aplica una ligera succión. De cada uno de los animales se toma una cantidad similar de contenido ruminal, que se recoge en un termo precalentado a 38°C. El contenido ruminal se filtra a través de 4 capas de gasa, con infusión continua de CO₂. El contenido ruminal se utilizó para preparar el inóculo para realizar incubaciones en frascos Wheaton (**experimento 1**). En cualquier caso, desde que se extrae el líquido ruminal de los animales hasta que se utiliza transcurren, como máximo, 30 minutos.

3.1.1. Construcción e implantación quirúrgica de cánulas ruminales.

Se utiliza un molde de aluminio, construido expresamente para este fin, y goma sin recauchutar cruda, neutra y con un espesor de 0,8-1 mm (Michelín, ref. RIDAR 1-8, 580820). En cada una de las caras del molde, previamente impregnadas con vaselina, se colocan cinco capas de goma. El molde, cerrado herméticamente, se

Capítulo 3

coloca en estufa a 160°C durante 2 horas para proceder a la vulcanización de la goma. Una vez que el molde se enfría, se extrae la cánula, cuyo orificio central se cierra mediante un tapón de silicona comercial, fabricado manualmente con un molde de escayola. Durante los dos días previos a la intervención quirúrgica se administra a los animales, por vía intramuscular, un antibiótico con acción bactericida frente a gérmenes anaerobios (Augmentine, Lab. Smithkline Beecham; 0,14 ml/kg de peso vivo). Los animales no reciben alimento ni agua durante las 36 y 24 horas previas a la intervención, respectivamente. Quince minutos antes de comenzar la operación se toma la temperatura rectal de los animales y se les inyecta, por vía subcutánea, 1 ml de solución de Atropina al 1% p/v. Como preanestésico se emplea Rompún® (Lab. Bayer), que se administra intramuscularmente (0,15 ml/10 kg de peso vivo). Como anestésico se emplea Ketolar® (Lab. Parke-Davis), aplicado lentamente en la vena yugular, en una dosis inicial de inducción de 2 mg/kg de peso vivo. El estado de anestesia se mantiene aplicando, también a través de la yugular, 1 mg de anestésico por kg de peso vivo, a requerimiento de las manifestaciones de disminución del estado anestésico del animal (nistagmo y movimientos de respuesta al estímulo). La cánula se implanta en la fosa prelumbar izquierda. Para ello, se rasura y desinfecta la zona lavando con jabón antiséptico y aplicando povidona yodada (Betadine, Lab. Rovi). Se realiza una laparotomía oblicua izquierda, seccionando la piel, separando los haces de fibras de los diferentes planos musculares (músculos oblicuo externo, oblicuo interno y transversos del abdomen) y disecando el peritoneo. Este último se fija, mediante pinzas hemostáticas, y se practica una incisión para formar una abertura de tamaño similar a la cutánea y así alcanzar la cavidad abdominal. Se localiza el saco dorsal del rumen en el que se practica una incisión vertical para implantar la cánula. La incisión se sutura cuidando de que contacten las mucosas para favorecer la fistulización. La unión de los distintos tejidos se hace por separado uniéndose el peritoneo al músculo transversos del abdomen y los dos músculos oblicuos del abdomen entre sí; todo ello con hilo de sutura absorbible Dexon 4/0 USP. La piel y tejidos subcutáneos se unen mediante sutura cruzada doble, con hilo de seda 2/0 USP (Lab. Braun). Tras la intervención, los animales se alojan en jaulas individuales, con cama de paja y se les suministra agua, heno de alfalfa y mezcla mineral-vitamínica en bloques. Durante los tres días posteriores a la operación se controla diariamente la temperatura rectal de

los animales y se les administran antibióticos, como se ha mencionado para el periodo preoperatorio.

3.2. DIETAS

En la serie de ensayos correspondientes al **experimento 1**, se utilizan 13 dietas: una, como tratamiento control, constituida por heno de alfalfa y concentrado en la relación 1:1 (dieta CO), y 12 dietas experimentales en las que el 50, 75 o 100% del concentrado de la dieta CO se sustituye por bloques multinutrientes que incluyen destríos de tomate (dietas T50, T75 y T100, respectivamente), pepino (dietas C50, C75 y C100, respectivamente), una mezcla 1:1 de tomate y pepino (dietas TC50, TC75 y TC100, respectivamente) o cebada (dietas B50, B75 y B100, respectivamente). En las distintas incubaciones también se incluyeron heno de alfalfa (HA), como estándar, y un blanco (BL). La composición de las dietas en ingredientes así como la composición química de estos aparecen en la publicación 1 (Capítulo 4).

En los ensayos incluidos en el **experimento 2** se utilizaron 4 dietas. Una dieta control, constituida por heno de alfalfa y concentrado en la relación 1:1 (dieta AC), y 3 dietas experimentales en las que el 50% del concentrado de la dieta AC se sustituyó por bloques multinutrientes que incluyen destríos de tomate (dieta ACT) o de pepino (dieta ACC). Además, se empleó una dieta en la que la mayor parte de los carbohidratos del bloque procedían de cebada grano (dieta ACB). La composición de estas dietas en ingredientes así como la composición química de los ingredientes aparecen en la publicación 2 (Capítulo 4).

Las dietas empleadas en los ensayos correspondientes al **experimento 3** eran similares a las empleadas en el **experimento 2**, diferenciándose en la proporción de concentrado de la dieta AC que se sustituía, en las dietas experimentales, por bloques multinutrientes, y que era del 35% en este tercer experimento.

3.3. CULTIVOS NO RENOVADOS DE MICROORGANISMOS RUMINALES (CNRMR)

Para llevar a cabo el **experimento 1** se han utilizado frascos Wheaton de unos 120 ml de capacidad, que se sellan con tapones de goma y arandelas de aluminio a presión. Los frascos se incuban en un baño de agua a $39^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$. Para optimizar el control de la temperatura y de las pérdidas de agua, los frascos se cubren con papel de aluminio y con trozos de poliespán.

El medio de cultivo en el que se incuban las muestras consiste en una mezcla de filtrado del contenido del rumen y una disolución tamponadora (Goering and Van Soest, 1970) en la

Capítulo 3

proporción 1:4 (v:v). La composición de esa disolución aparece en la **Tabla 3.1** de este capítulo. Previamente a su incorporación al contenido ruminal filtrado, la disolución tampón se gasea con CO₂, durante una hora a partir del momento en el color de la resazurina disuelta en la mezcla vira de morado a rosa, indicativo de una adecuada reducción de la misma. Aproximadamente 500 mg de MS de las muestras problema se incuban en los frascos durante un periodo de 72 horas, realizándose mediciones de presión y volumen del gas de fermentación producido cada dos horas durante las primeras 12 horas y a las 24, 48 y 72 horas tras la inoculación de los frascos (**Figura 3.1**).

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

	g/L
Na ₂ HPO ₄	5,7
KH ₂ PO ₄	6,2
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,6
CaCl ₂ .2H ₂ O	13,2
MnCl ₂ .4H ₂ O	10,0
CoCl ₂ .6H ₂ O	1,0
FeCl ₃ . 6H ₂ O	8,0
NaHCO ₃	37,0
(NH ₄)HCO ₃	2,0
Resazurina	1,0
Cisteína-HCl	6,25
NaOH (1N)	40,0
Na ₂ S	6,25



Figura 3.1. Medida de la presión y del volumen de gas de fermentación en los frascos Wheaton.

3.4. DESARROLLO EXPERIMENTAL

3.4.1. Experimento 1

Se llevaron a cabo 3 series de incubaciones en los frascos Wheaton mencionados en el **apartado 3.3**. El inóculo ruminal se obtuvo de la forma ya descrita en apartados anteriores, a partir de animales alimentados con una dieta a base de heno de alfalfa y concentrado, y se mezcló con la solución tampón cuya composición aparece en la **Tabla 3.1**. La mezcla se distribuyó, mediante un dispensador, en los frascos Wheaton (50 ml/frasco), que contenían 0,5 g de MS de la dieta correspondiente, manteniéndose la infusión de CO₂ tanto sobre el inóculo como en los frascos Wheaton. A las 2, 4, 6, 8, 12, 24, 48 y 72 horas de iniciarse la incubación se procedió a la medida de la presión y del volumen de gas de fermentación en cada uno de los frascos, utilizándose un manómetro Wide Range Pressure Meter (Sper Scientific LTD, Scottsdale, AZ, USA) y una jeringa de vidrio calibrada, respectivamente. A las 24 y 48 horas de incubación se tomó una alícuota del gas producido en un vacutainer de 10 mL (Venoject[®], Terumo Europe N.V., Leuven, Belgium) para determinar su concentración en CH₄. En cada una de las series de incubación la mitad de los frascos se abrieron transcurridas 24 horas desde la incubación y la otra mitad transcurridas 72 horas. Tras la apertura de los frascos se midió el pH del contenido, se detuvo la fermentación introduciendo los frascos en hielo y se recogieron alícuotas (1 ml) para la determinación del contenido en ácidos grasos volátiles (AGVs). El resto del contenido de los frascos se pesó, se congeló a - 80°C y se liofilizó. La muestra liofilizada se utilizó para determinar su contenido en MS y fibra neutro detergente (FND). Para la extracción del ADN total se utilizó una alícuota de la muestra liofilizada. El ADN extraído se utilizó para la cuantificación de bacterias totales y archaeas metanogénicas.

3.4.2. Experimento 2

El diseño experimental corresponde a un cuadrado latino 4 x 4, de forma que cada tratamiento dietético se ensaya en un total de 4 animales. El ensayo incluye 4 períodos experimentales, en cada uno de los cuales los animales se adaptan a las dietas en receptáculos individuales durante 25 días y, en jaulas metabólicas durante 3 días más, para posteriormente comenzar con una fase de recogida de heces y orina producidas durante 5 días. A lo largo de todo el ensayo los animales reciben la dieta correspondiente en una sola toma, a las 09:00 horas. Estas dietas se suministraron en

Capítulo 3

cantidad suficiente para cubrir las necesidades energéticas de mantenimiento de los animales experimentales (Prieto et al., 1990).

Al inicio de cada período experimental se toman muestras representativas de todos los ingredientes de las dietas suministradas a los animales y se conservan a -20°C hasta su análisis. Durante los 5 días de recogida de heces y orina se pesan diariamente ambas así como los rehusos de los ingredientes suministrados. Posteriormente se toma una alícuota de cada tipo de muestra (20%, 10%, y 30% de heces, orina y rehusos, respectivamente) y se conservan a -20°C hasta su análisis. Durante estos 5 días de muestreo también se recoge diariamente la orina producida en cubos que contienen 50 ml de ácido clorhídrico al 10% (vol/vol), con objeto de mantener un valor de $\text{pH} < 3$ y evitar la degradación microbiana de sus derivados púricos. Se registra el volumen y peso de la orina producida y se toman diariamente alícuotas de aproximadamente 100 ml para conservarse a -20°C hasta el análisis de su contenido en derivados púricos y concentración de creatinina.

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

Las muestras de orina se descongelan y se filtran a través de papel de filtro, procediéndose, a continuación, a la determinación de su contenido en N total. Para la determinación de su contenido en energía, creatinina y derivados púricos se utilizan alícuotas liofilizadas.

El día 34 de cada período y antes de administrar la comida, se toma una muestra del contenido del rumen de cada animal (100 mL aproximadamente). Estas muestras se filtran a través de dos capas de gasas, y se registra su pH inmediatamente (pH-metro Metrohm 691 dotado de sonda y adaptado para mediciones de pH entre 0 y 14, a

temperaturas de 0 a 80°C). A continuación, se toman tres alícuotas del filtrado: una de 1 ml a la que se añade 1 ml de HCl 0,5 N para la determinación de la concentración de N-NH₃; otra de 800 µl a la que se añaden 800 µl de una solución de HCl 0,5 N, que contiene además, ácidos ortofosfórico y crotónico (patrón interno), para la determinación del contenido en ácidos grasos volátiles (AGVs); otra alícuota de aproximadamente 50 mL se utiliza para llevar a cabo, mediante técnicas moleculares, la diversidad y abundancia de bacterias totales y archaeas metanogénicas así como la secuenciación de las arqueas. El día 34 de cada período y antes de administrar la comida, también se recoge muestra suficiente (aproximadamente 500 ml) del contenido del rumen de cada animal para el aislamiento de las bacterias totales del rumen (TB), que se utilizarán como referencia para la estimación del flujo de N microbiano al duodeno. El contenido del rumen se filtra a través de 4 capas de gasas. La fracción líquida se conservó a 4°C, mientras que la fracción sólida se resuspendió en frío (4°C) en una solución de NaCl (9 g / L de sólido) y metilcelulosa al 0.1% (3 mL / g de sólido) y se incubó a 38°C durante 15 minutos en agitación constante. La solución se introduce en bolsas de plástico y se somete a un golpeo mecánico, con un masticador artificial (Masticador IUL Instruments GMBH, Königswinter, Alemania) durante 5 minutos, para desprender las bacterias asociadas a las partículas de alimento y se conserva a 4°C durante 24 horas. Dicha solución se vuelve a filtrar a través de 4 capas de gasas y se hace mezcla con la fracción líquida original. La mezcla resultante se centrifuga (500 × g durante 10 minutos a 4°C) y el sobrenadante obtenido se vuelve a centrifugar a 20,000 × g durante 30 minutos a 4°C (Centrifuga Sorvall[®] RC6 Plus Sorvall instruments, Dupont). La fracción bacteriana precipitada se resuspende en frío (4°C) usando la solución de NaCl (9 g / L) previamente mencionada y se centrifuga de nuevo (20,000 × g durante 30 minutos a 4°C). El residuo final obtenido se recupera en placa de Petri y se conserva a - 20° C hasta su liofilización. Tras la liofilización las muestras se muelen finamente con la ayuda de un pequeño mortero y se analiza su contenido en MS, N y BP. Durante los días 36, 37, 38 y 39 de cada período los animales se colocaron en cámaras de respirometría (1.8 m ancho × 1.8 m fondo × 1.5 m alto) para medir las emisiones de CH₄ correspondientes a las distintas dietas. Las cámaras están construidas en policarbonato sobre una estructura metálica. La temperatura del aire de la cámara se mantiene entre 10 y 20°C. Todos los días, a las 0900 h, se interrumpen las mediciones para alimentar a los animales y limpiar las instalaciones. Estas interrupciones no duraban más de 10 minutos para que no influyeran en la cantidad total de metano

Capítulo 3

producido. El flujo del aire en cada cámara se mide dos veces al día usando un anemómetro. Para determinar la producción de metano se tiene en cuenta el flujo de aire en la cámara y la concentración de metano en el aire, que se media continuamente con un analizador de gases (Gas analyser ADC MGA3000 Spurling Works, Herts, UK). Los datos se obtienen teniendo en cuenta sólo las medidas realizadas durante los dos últimos días de cada periodo considerándose los dos primeros días como adaptación de los animales a las cámaras.

3.4.3. Experimento 3

El diseño experimental corresponde a un cuadrado latino 4 x 4 con replicas, de forma que cada tratamiento se ensaya en un total de 8 animales. El ensayo incluye 4 periodos experimentales, en cada uno de los cuales los animales se adaptan a las dietas en receptáculos individuales durante 25 días y, en jaulas metabólicas, durante 3 días más. Posteriormente se realiza una fase de recogida de las heces y orina producidas durante 5 días. Diariamente los animales reciben la dieta correspondiente en una sola toma, a las 09:00 horas. Estas dietas se suministraron en cantidad suficiente para permitir una producción de leche de hasta 2 kg en los animales experimentales (Aguilera et al., 1990).

Al inicio de cada período experimental se toman muestras representativas de todos los ingredientes y se conservan a -20°C hasta su análisis. Durante los 5 días de muestreo se recogen y se pesan diariamente las heces y la orina así como los rehusos de los ingredientes no ingeridos. Posteriormente se toma una alícuota de cada tipo de muestra (20%, 10%, y 30% de heces, orina y rehusos, respectivamente) y se conservan a -20°C hasta su análisis. Durante estos 5 días de muestreo también se recoge diariamente la orina producida en cubos que contienen 50 ml de ácido clorhídrico al 10% (vol/vol), con objeto de mantener un valor de $\text{pH} < 3$ y evitar la degradación microbiana de sus derivados púricos. Se registra el volumen y peso de la orina producida y se toman diariamente alícuotas de aproximadamente 100 ml para conservarse a -20°C hasta el análisis de su contenido en derivados púricos y concentración de creatinina.

Previamente a su análisis, las muestras de heces se liofilizan mientras que las del alimento (suministrado y rehusado) se desecan en estufa de ventilación forzada a 60°C durante 48 h, estabilizándose ambos tipos de muestras, a continuación, durante 48 horas

a temperatura ambiente. Las muestras de heces, ingredientes y rehusos se muelen en molino de cuchillas (Retsch, Mod. SM-1) con tamiz de 1 mm para la determinación analítica del contenido en MS, MO, EE, N total, FND, FAD, LAD y EB. Los carbohidratos no fibrosos (CNF) se calculan como $CNF = MO - (FND + PB + EE)$. El porcentaje de digestibilidad aparente (%Da) se calcula como: $\%Da = (I-E/I) \times 100$, siendo I la cantidad de nutriente ingerido y E la de nutriente excretado, ambos expresados en función de la materia seca de alimento y heces. Las muestras de orina se descongelan y se filtran a través de papel de filtro, procediéndose, a continuación, a la determinación de su contenido en N total y, tras su liofilización, a la determinación de su contenido en EB.

El día 34 de cada período y antes de administrar la comida, se toma una muestra del contenido del rumen de cada animal (100 mL aproximadamente) usando una sonda nasogástrica acoplada a una bomba de vacío. Estas muestras se filtran a través de dos capas de gasas y se registra el pH inmediatamente (pH-metro Metrohm 691 dotado de sonda y adaptado para mediciones de pH entre 0 y 14, a temperaturas de 0 a 80°C). A continuación se toman tres alícuotas del filtrado: una de 1 ml a la que se añade 1 ml de HCl 0,5 N para la determinación de la concentración de N-NH₃; otra de 800 µl a la que se añaden 800 µl de una solución de HCl 0,5 N, que contiene, además, ácidos ortofosfórico y crotónico (patrón interno), para la determinación del contenido en ácidos grasos volátiles (AGVs); y otra de aproximadamente 50 mL para análisis moleculares de diversidad y cuantificación de bacterias totales y archaeas metanogénicas.

Durante cada uno de los períodos experimentales los animales se ordeñaron a mano cada día antes del suministro del alimento y se midió la producción de leche. Durante los 5 días de la fase previamente descrita para la recogida de heces y orina, además, se midió la densidad de la leche y se tomaron alícuotas que se conservaron a -30°C, para posteriormente determinar su composición en grasa, proteína, lactosa, caseína y sólidos totales así como el perfil en ácidos grasos de la fracción grasa. El contenido en sólidos totales de la leche se determinó mediante liofilización. Para determinar su contenido en N se siguió el procedimiento de Kjeldahl. El contenido en N no proteico se analizó en muestras de leche filtradas después de precipitar en una solución de TCA al 12% (wt/vol). El contenido en N no caseínico se determinó en muestras de leche filtradas después de precipitar en una solución de ácido acético al 10% (wt/vol) a pH 4,1 (Recio et al., 1997). El contenido en proteína de la leche se calculó multiplicando su contenido

Capítulo 3

en N por 6,38. El contenido en grasa de la leche se hizo siguiendo el método Gerber (Pearson, 1976). El contenido total en ácidos grasos de la leche fue extraído siguiendo las recomendaciones de Toral et al. (2011), mientras que los ácidos grasos de los ingredientes de las dietas fueron extraídos según el método de Folch et al. (1957) con las modificaciones de Devillard et al. (2006). Para determinar el perfil en ácidos grasos de la grasa de la leche y de los ingredientes de las dietas, los ácidos grasos esterificados con un grupo metilo fueron separados y cuantificados usando un cromatógrafo de gases (Model Focus GC, Thermo Scientific, Milan, Italy) equipado con un detector de llama iónica (FID), una columna de 100m (0.25 mm i.d., 0.2- μ m film thickness; TR-CN100, Teknokroma, Barcelona, Spain) y usando He como gas conductor. Los picos fueron posteriormente identificados comparándolos con los tiempos de retención de los patrones utilizados (47885-U, N5252, y O5632: Sigma Aldrich, Madrid, Spain; 20-1813-9: Larodan Fine Chemicals, Malmö, Sweden) y con cromatogramas presentes en otras publicaciones (e.g., Shingfield et al., 2003; Kramer et al., 2008). La identificación fue validada gracias a la utilización del espectrómetro de masas del cromatógrafo de gases (ITQ 900, Thermo Scientific, Austin, TX) siguiendo las recomendaciones de (Shingfield et al., 2003) y comparando los espectros de masa obtenidos con bases de datos de referencia (<http://lipidlibrary.aocs.org/ms/masspec.html>).

Durante los días 36, 37, 38 y 39 de cada período los animales se colocaron en cámaras de respirometría (1.8 m ancho \times 1.8 m fondo \times 1.5 m alto) para medir las emisiones de CH₄ correspondientes a las distintas dietas. Las cámaras están construidas en policarbonato sobre una estructura metálica. La temperatura del aire de la cámara se mantiene entre 10 y 20°C. Todos los días a las 0900 h se interrumpían las mediciones para limpiar las instalaciones y alimentar y ordeñar a los animales. Estas interrupciones no duraban más de 10 minutos para que no influyeran en la cantidad total de metano producido. El flujo del aire en cada cámara se mide dos veces al día usando un anemómetro. Para determinar la producción de metano se tiene en cuenta el flujo de aire en la cámara y la concentración de metano en el aire, que se media continuamente con un analizador de gases (Gas analyser ADC MGA3000 Spurling Works, Herts, UK). Los datos se obtienen teniendo en cuenta solo las medidas realizadas durante los dos últimos días de cada periodo considerándose los dos primeros días como adaptación de los animales a las cámaras.

3.5. TÉCNICAS EXPERIMENTALES Y ANALÍTICAS

Puesto que la mayor parte de las técnicas experimentales y analíticas se han descrito con detalle en trabajos anteriores de nuestro grupo de investigación (Martin-García, 2001; Moumen, 2003; Yáñez-Ruiz, 2003; Cantalapiedra, 2009; Molina-Alcaide et al., 2010a; Soto-Martín, 2011), en este capítulo se hace una descripción pormenorizada sólo de las técnicas moleculares que representan una novedad con respecto a trabajos anteriores del grupo.

En todos los experimentos se cuantificaron bacterias totales y archaeas metanogénicas presentes en el contenido ruminal mediante PCR a tiempo real. La cuantificación de las muestras del **experimento 1** se realizó en los laboratorios del Instituto en Formación de Nutrición Animal (CSIC, Armilla), mientras que las muestras de los **experimentos 2 y 3** se analizaron en el Departamento de Ciencias Animales de la Universidad de Vermont, Burlington, USA. En esta Universidad también se ha analizado la diversidad en archaeas metanogénicas presentes en el contenido del rumen de cabras en mantenimiento (**experimento 2**) y en lactación (**experimento 3**). Para ello, se utiliza la secuenciación masiva (454 GS FLX Titanium, Roche) de amplicones de las regiones hipervariables (V1-V3) del gen ARNr 16S. La preparación de las muestras y la extracción de su ADN son ligeramente diferentes en los dos laboratorios.

3.5.1. Preparación de las muestras y extracción de ADN

Experimento 1. El contenido de los frascos de incubación, liofilizado, disgregado y homogeneizado de forma somera con una espátula estéril, se deposita en tubos estériles de 2 ml con tapón de rosca, llenando aproximadamente hasta $\frac{3}{4}$ de su volumen y se añaden 3 bolas de acero de un diámetro de 2,3 mm, previamente esterilizadas. El procedimiento se lleva a cabo en condiciones estériles, esto es en una campana de flujo laminar y utilizando alcohol etílico para desinfectar los instrumentos. Los frascos con las muestras se guardan a -80°C durante un tiempo aproximado de 15 minutos, con el fin de reducir la posibilidad de degradación del material genético por el calentamiento que puede provocar el rozamiento durante la agitación. Las muestras contenidas en los tubos se someten a una intensa pulverización a 5.000 rpm utilizando un agitador Mini-Beadbeater-8 (Bio Spec Products Inc.) durante 1 minuto, para asegurar una óptima homogeneización de las muestras previa a la extracción de ADN.

Capítulo 3

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

Experimentos 2 y 3. Se usó el protocolo de repetición de Bead Beater (Mini-bead Beater; BioSpec Products, Bartlesville, OK) con columnas (QIAmp® DNA Stool Mini Kit), siguiendo las recomendaciones de Yu y Morrison (2004).

Aproximadamente 0,25 g de muestra liofilizada, disgregada y homogeneizada de forma somera con una espátula estéril, se depositan en tubos estériles de 2 ml con tapón de rosca. Se añade 1 mL de tampón de lisis y 0,4 g de bolas de zirconio estériles (0,3 g de 0,1 mm y 0,1 g de 0,5 mm). Los tubos se someten a una intensa pulverización a 5.000 rpm introduciéndolos en un agitador Mini-Beadbeater-16 (Bio Spec Products Inc.) durante 3 minutos, para asegurar una óptima homogeneización de las muestras previa a la extracción de ADN. Se incuban en un baño de agua caliente a 70°C durante 15 minutos, agitándose cada 5 min y se centrifugan a 16.000 g y 4°C durante 5 minutos. El sobrenadante se transfiere a un tubo de 2 mL de capacidad. Se añaden 300 µl de tampón de lisis al primer tubo original y se repite todo el proceso (Bead-Beater e incubación). Se añade una pastilla inhibitec (QIAmp® DNA Stool Mini Kit; Qiagen GMBH) a la mezcla obtenida, se agita en vórtex durante 1 minuto y se incuba a temperatura ambiente otro minuto para luego centrifugar (16.000 g durante 3 minutos). El sobrenadante se transfiere a un nuevo tubo de 2 mL. Se añaden a cada tubo 260 µl de acetato de amonio 10M, se mezcla, se incuba en hielo durante 5 minutos y se centrifuga (16.000 g a 4°C durante 10 minutos). El sobrenadante que resulta se reparte en dos tubos de 1,5 mL, se añade la misma cantidad de Isopropanol 100%, se mezcla y se incuba durante 30 minutos en hielo. A continuación se centrifuga (16.000 g a 4°C

durante 15 minutos) descartándose el sobrenadante. El residuo se lava con 100 µl de etanol al 70%, que se tira, y se deja secar a temperatura ambiente. Una vez seco el ADN se resuspende en 100 µl de tampón TE, se agita en vórtex y se mezclan los contenidos de los dos tubos pertenecientes a la misma muestra.

Para eliminar el ARN y la proteína y purificar se añaden 15 µl de proteinasa K y 200 µl de tampón AL, se mezcla bien y se incuba a 70°C durante 10 minutos. Se pipetea 200 µl de etanol al 100%, se mezcla bien, se transfiere a una columna QIAmp (QIAmp® DNA Stool Mini Kit; Qiagen GMBH) y se centrifuga (16.000 g durante 1 minuto). Se descarta el residuo obtenido, se añaden 500 µl de tampón AW1 a la columna y se centrifuga (16.000 g durante 1 minuto). Se descarta el residuo obtenido, se añaden 500 µl de tampón AW2 a la columna y se centrifuga (16.000g durante 1 minuto). Se tira el residuo obtenido y se centrifuga de nuevo para secar la columna (16.000 g durante 1 minuto).

La columna con filtro se coloca sobre un nuevo tubo de 1,5 mL, se añaden 200 µl de tampón AE, se incuba a temperatura ambiente durante 2 minutos y se centrifuga para eluir el ADN (16.000 g durante 1 minuto). Finalmente el ADN de la muestra correspondiente se tiene en un tubo de 1,5 mL.

3.5.2. Reacción en Cadena de la Polimerasa en tiempo real o PCR cuantitativa

Los cebadores empleados para cuantificar las poblaciones de bacterias totales y arqueas metanogénicas se detallan en las **Tablas 4.1.3, 4.2.2 y 4.3.3** de las **publicaciones 1, 2 y 3**, respectivamente.

El fluorocromo SYBR Green I, debido a su inespecificidad por el ADN de cadena doble, puede marcar también amplificaciones no específicas o dímeros de cebadores. Es necesario optimizar el proceso para evitar la formación de este tipo de artefactos. La temperatura de anillamiento óptima, que no producía amplificaciones indeseadas o los citados dímeros, fue de 60°C en todos los casos. El protocolo de amplificación usado para la cuantificación de los distintos grupos microbianos y para la construcción de la curva de disociación se detalla en las **Tablas 3.2 y 3.3**, incluidas en este apartado.

Capítulo 3

Tabla 3.2. Protocolo de amplificación y generación de la curva de disociación utilizados para la cuantificación de los grupos microbianos en las muestras correspondientes al experimento 1.

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

Tabla 3.3. Protocolo de amplificación y generación de la curva de disociación empleados para la cuantificación de los grupos microbianos en las muestras correspondientes a los experimentos 2 y 3.

	Temperatura	Duración	Nº de repeticiones
Desnaturalización inicial	95°C	15 minutos	1 ciclo
Desnaturalización	95°C	30 segundos	
Anillamiento de cebadores	60°C	30 segundos	40 ciclos
Elongación de cebadores¹ y detección de fluorescencia	72°C	60 ó 30 segundos	
Construcción de la curva²	60 a 95°C	8 minutos	1 ciclo

¹ 60 o 30 segundos para bacterias totales y metanogénicas respectivamente.

² La curva de desnaturalización (“melting curve”) se construyó mediante lectura continua de la fluorescencia de la muestra mientras se calentaba de 60 a 95°C con incrementos de 0,5°C cada 10 segundos.

La mezcla de amplificación (25 µl) contenía:

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

Cuantificación absoluta de poblaciones microbianas

Los microorganismos considerados se cuantificaron de forma absoluta, en base al número de copias de fragmentos pertenecientes a las siguientes regiones génicas o intergénicas:

Experimento 1

- ADN- r 16S, en el caso de bacterias de Maeda et al. (2003).
- gen *mcrA* para arqueas metanogénicas de Denman et al. (2007).

Experimentos 2 y 3

- ADN- r 16S en el caso de bacterias de Denman y McSweeney (2006).
- gen *mcrA* para arqueas metanogénicas de Christophersen et al. (2008).

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

Capítulo 3

(bacterias transformadas) del plásmido pueden crecer, ya que solo en la secuencia de este plásmido se encuentran los genes de resistencia a esos antibióticos.

Tras la selección visual de las potenciales bacterias portadoras en la construcción genética, se verifica la presencia del fragmento de interés mediante PCR. A continuación, se extrae el plásmido mediante un kit Miniprep comercial y se secuencia el fragmento. El cotejado de la secuencia de nucleótidos obtenida, con información de alguna base de datos de secuencias (por ejemplo, Nucleotide del NCBI), mediante algún tipo de software de alineamiento tipo BLAST (NCBI), permitirá asegurar la presencia del fragmento deseado en el plásmido. A partir del peso molecular del plásmido que contiene el inserto y de la concentración del mismo en cada extracto plasmídico, se puede establecer el número de copias del plásmido, igual al número de copias del fragmento de interés en cada una de las diluciones realizadas.

No obstante, los estándares empleados para la cuantificación de archaeas metanogénicas en los **experimentos 2 y 3** se obtuvieron a partir de diluciones de cultivos puros de *Methanobrevibacter ruminantium* M1^T y *Methanobrevibacter smithii* PS^T según describe Christophersen et al. (2007), que varían de 1.0×10^3 a 1.0×10^8 células.

3.5.3. Pirosecuenciación 454 FLX-titanium

Como se ha mencionado en el capítulo de revisión bibliográfica, es requisito imprescindible para llevar a cabo estudios de diversidad microbiana con este tipo de sistemas seguir una serie de pasos: construcción de librerías; PCR en emulsión; pirosecuenciación y lectura de secuencias.

3.5.3.1. Construcción de librerías

La librería es la colección de amplicones, generados a partir de las muestras a analizar, normalmente el gen ARNr 16S o algunas de sus regiones hipervariables (V1 a V9). Además, los sistemas de la plataforma 454 permiten mezclar muestras pertenecientes a distintos tratamientos y agruparlas e identificarlas posteriormente para su análisis (Andersson et al., 2008). Esto es posible gracias a la incorporación, en los primers, de secuencias de nucleótidos conocidas (4 a 10) o “*barcodes*”. La construcción de la librería consiste brevemente en *i*) la extracción de ADN de las muestras (**apartado 3.5.1**), *ii*) amplificación de la región deseada del gen ARNr 16S mediante PCR,

utilizando una polimerasa de alta fidelidad e incluyendo en el extremo 5' de los primers unos adaptadores de secuencia conocida recomendados por la empresa del secuenciador, siendo posible incorporar barcodes para discriminar muestras; *iii*) purificación y limpieza de los productos de PCR y ; *iv*) cuantificación y mezcla equimolar de las distintas muestras.

3.5.3.1.1. Amplificación del ADN mediante PCR

Se realiza una primera PCR para comprobar la presencia de archaeas en las muestras problema. Se amplifica el gen para el ARN ribosómico 16S, empleando para ello primers específicos para metanogénicas, *Met86F* y *Met1340R* (Wright y Pimm, 2003) (**Tabla 3.5**). El protocolo de amplificación usado para comprobar la presencia de metanogénicas se detalla en la **Tabla 3.4**, incluida en este apartado.

Tabla 3.4. Protocolo de amplificación del gen ARNr 16S de metanogénicas.

	Temperatura	Duración	Nº de repeticiones
Desnaturalización inicial	95°C	4 minutos	1 ciclo
Desnaturalización	95°C	30 segundos	
Anillamiento de cebadores	58°C	30 segundos	40 ciclos
Elongación de cebadores	72°C	90 segundos	
Elongación final de cadenas	72°C	10 minutos	1 ciclo

Table 3.5. Primers usados en la PCR para amplificar el gen ARNr 16S de archaeas metanogénicas.

Nombre	Secuencia	Referencia
<i>Met86F</i>	5'-GCTCAGTAACACGTGG-3'	Wright and Pimm, 2003
<i>Met1340R</i>	5'-CGGTGTGTGCAAGGAG-3'	

La mezcla de amplificación (50 µl) de la PCR contenía:

- 10X PCR Buffer. 5 µl
- dNTPs (2,5 mM cada uno). 1 µl
- Cebador *Met86F* (10 µM). 5 µl
- Cebador *Met1340R* (10 µM). 5 µl

Capítulo 3

- MgCl ₂ (50mM).	1,5 µl
- iTaq.	0,2 µl
- Agua miliQ.	31,5 µl
- ADN (eluido en buffer AE).	1 µl

La región seleccionada para llevar a cabo el screening de la diversidad de archaeas metanogénicas corresponde a las regiones hipervariables V1- V3 del gen para el ARN ribosómico 16S (Muyzer et al., 1993). El protocolo de amplificación aparece en la **Tabla 3.6**, y requiere la utilización de una polimerasa de alta fidelidad (iProof). Los cebadores (*Met86F* y *Met519R*) empleados se detallan en la **Tabla 3.7**. Estos primers generan amplicones de unos 500 pares de bases a partir de las muestras, lo que permite identificar y clasificar un amplio rango de especies microbianas. Los primers utilizados incorporan unos adaptadores (**A** para el primer forward y **B** para el reverse) recomendados por el fabricante del secuenciador 454 GS FLX (Roche) y de secuencia conocida (**Tabla 3.7**), necesarios para que se pueda iniciar la cadena de reacciones para la secuencian masiva de los amplicones generados. Entre el adaptador y la secuencia del primer se incorpora, además, un código de barras o “*barcode*”, constituido por una secuencia de 4 nucleótidos conocidos que permite identificar cada una de las muestras una vez secuenciadas (**Tabla 3.7**). Este modo de identificación tiene la ventaja de permitir obtener una mezcla de amplicones de distintas muestras y tratamientos e identificar, entre las secuencias obtenidas, las que corresponden a un determinado animal o tratamiento. Roche recomienda no secuenciar mezclas con más de 16 barcodes en un mismo pocillo o ¼ de placa ya que puede reducirse la eficiencia del proceso.

Tabla 3.6. Protocolo de amplificación de las regiones hipervariables del gen ARNr 16S de archaeas metanogénicas.

	Temperatura	Duración	Nº de repeticiones
Desnaturalización inicial	98°C	4 minutos	1 ciclo
Desnaturalización	98°C	30 segundos	
Anillamiento de cebadores	61°C	30 segundos	40 ciclos
Elongación de cebadores	72°C	30 segundos	
Elongación final de cadenas	72°C	10 minutos	1 ciclo

Table 3.7. Primers usados en la PCR para amplificar el gen ARNr 16S de archaeas metanogénicas.

Secuencia sentido 5' a 3'			
Primer ID	ADAPTADOR (A para forward, B para reverse)	BARCODE	PRIMER (86F o 519R)
Met21-F	GCC TCC CTC GCG CCA TCA G	AATT	G CTC AGT AAC ACG TGG
Met21-R	GCC TTG CCA GCC CGC TCA G	AATT	G WRT TAC CGC GGC KGC TG
Met37-F	GCC TCC CTC GCG CCA TCA G	ACCA	G CTC AGT AAC ACG TGG
Met37-R	GCC TTG CCA GCC CGC TCA G	ACCA	G WRT TAC CGC GGC KGC TG
Met23-F	GCC TCC CTC GCG CCA TCA G	AACC	G CTC AGT AAC ACG TGG
Met23-R	GCC TTG CCA GCC CGC TCA G	AACC	G WRT TAC CGC GGC KGC TG

La mezcla de amplificación (50 µl) de la PCR contenía:

- 5X PCR tampón.	10 µl
- dNTPs (2,5 mM cada uno)	1 µl
- Cebador <i>Met86F</i> + Adaptador + Barcode (10 µM)	1,25 µl
- Cebador <i>Met519R</i> + Adaptador + Barcode (10 µM)	1,25 µl
- MgCl ₂ (50mM)	0,5 µl
- iProof	0,5 µl
- Agua miliQ	34,5 µl
- ADN (eluido en tampón AE)	1 µl

3.5.3.1.2. Electroforesis, tinción, visualización y corte de bandas

Los productos resultantes de la PCR de las regiones hipervariables V1-V3 se cargaron, junto con un tampón de carga, en los pocillos de un gel de agarosa al 1% aplicándose una diferencia de potencial de 100 V durante 120 minutos (**Figura 3.2**). Tras la electroforesis, el gel se tiñe en una solución de Bromuro de Etidio al 0,0001% durante 15 minutos. Una vez teñido, se toma una fotografía de gel usando un equipo transiluminador (Bio-Rad, Gel Doc™ XR) mediante el software Image Lab (Bio-Rad Laboratories Corp.) **Figura 3.3**.

Capítulo 3

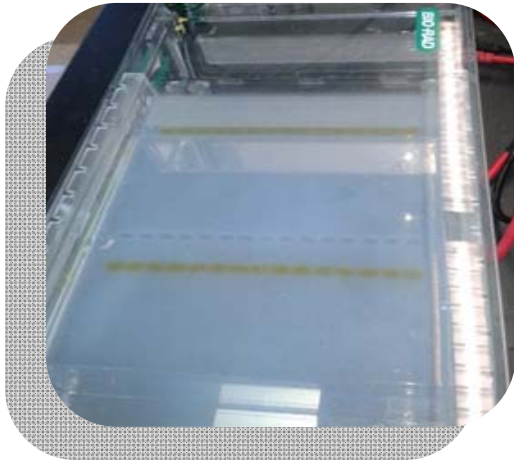


Figura 3.2. Electroforesis gel.

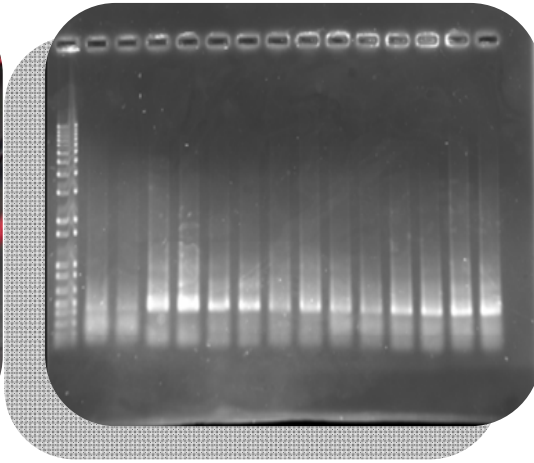


Figura 3.3. Fotografía gel en transiluminador.

Se comprueba que el tamaño de las bandas encontrado corresponde al esperado para los amplicones deseados (aproximadamente 500 pb). Posteriormente, se cortan las bandas deseadas visualizándose estas sobre una pantalla con luz ultravioleta y se guardan en tubos de 1,5 mL hasta su extracción y purificación (Figura 3.4).

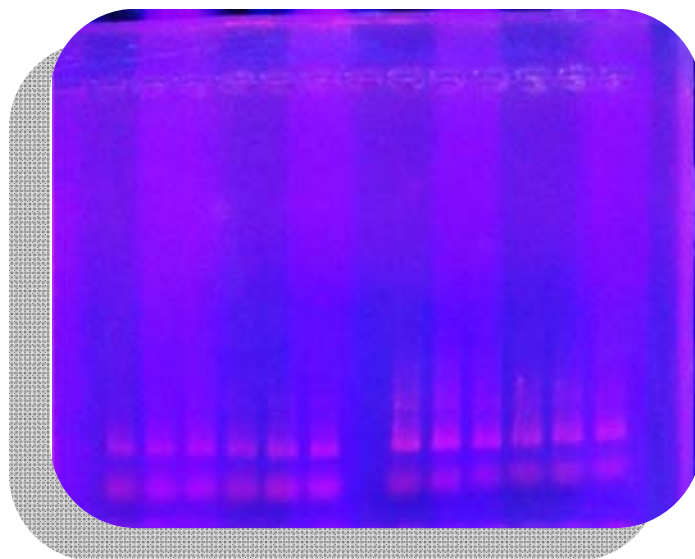


Figura 3.4. Corte de bandas sobre pantalla con luz UV.

3.5.3.1.3. Extracción, purificación del ADN del gel y preparación de la mezcla de muestras

El ADN de los amplicones contenidos en las bandas se extrae y purifica usando el kit QIAEX[®] Gel Extraction Kit. Este kit permite purificar el ADN, gracias al uso de unos beads magnéticos en los que el ADN queda retenido. Siguiendo las recomendaciones

del fabricante, las bandas se incuban durante 10 minutos en buffer QX1 más QIAEX II (beads magnéticos) para fijar el ADN de la muestra. La muestra se limpia lavando con los tampones QX1 y PE, para finalmente eluir el ADN de cada muestra en 40 μ l de tampón TE.

Los amplicones purificados se someten a un nuevo proceso de limpieza y concentración para eliminar impurezas y amplicones de pequeño tamaño, presentes en la muestra. Para ello usamos un kit de beads magnéticos Agencourt[®] AMPure[®] XP, que permite limpiar y concentrar la muestra en un volumen final de 20 μ l de tampón TE. Las muestras se cuantifican mediante NanoDrop 2000C Spectrophotometer, y se mezclan en cantidades equimolares. El pool obtenido se concentra en un volumen final de 30 μ l usando acetato de amonio 2M e Isopropanol al 100%. Finalmente, se comprueba la cantidad y calidad del ADN en el pool mediante NanoDrop 2000C Spectrophotometer. La cantidad mínima requerida en el pool final debe ser de 750 ng de ADN. El conjunto de ADN se envió al servicio de secuenciación del Departamento de Genética de la Universidad de Pensilvania (Philadelphia, PA, USA; <http://www.med.upenn.edu/genetics/core-facs/dna-seq>), donde se completó el procesado de las muestras hasta su secuenciación.

3.5.3.2. Emulsión de PCR

Las hebras de ADN de la “librería” generada se amplifican masivamente en una emulsión de PCR (Margulies et al., 2005), es decir en la superficie de cientos de miles de gotas de agarosa a cuya superficie se unen millones de oligómeros complementarios a la región inicial de la secuencia de los amplicones de nuestra librería que han sido generadas por el adaptador incorporado a nuestros primers (adaptadores A y B, recomendados por el la empresa) (**Figura 2.12**). La emulsión de PCR es una mezcla de aceite y agua para aislar individualmente las gotas de agarosa dentro de una micela acuosa, que contiene los reactivos necesarios para la PCR, estando por tanto cada una de las gotas de agarosa hibridada a un único amplicón o secuencia específica de ADN. Esta emulsión se carga en una placa con micropocillos y se somete a una serie de ciclos de temperatura para que tenga lugar la reacción de PCR. Esta PCR en emulsión puede generar hasta 1.000.000 de copias de cada fragmento de ADN original hibridado a una gota de agarosa en unas pocas horas.

Capítulo 3

3.5.3.3. Pirosecuenciación y lectura de secuencias

Las muestras de los **experimentos 2 y 3** se secuenciaron por separado utilizándose $\frac{1}{4}$ de placa para cada uno de los experimentos. Las muestras se inyectaron en un dispositivo secuenciador 454 GS FLX Titanium (Roche) (<http://www.youtube.com/watch?v=bFNjxKHP8Jc>). De modo, que la emulsión se carga en la superficie de la placa con picopocillos del 454, cada uno de los cuales recogerá una única gota de agarosa. Esta placa consiste de pequeños pocillos que tienen en la punta una hebra de fibra óptica que mantiene unida la gota de agarosa al pocillo. Posteriormente, pequeñas bolas magnéticas y de látex de 1 μm de diámetro, las cuales tienen incorporadas las enzimas necesarias para la reacción de “pirosecuenciación”, son añadidas a los picopocillos que contienen las gotas de agarosa con los millones de copias de nuestros amplicones. Además las distintas soluciones de nucleótidos y de reactivos son incorporadas de forma continua a la reacción durante el proceso. El funcionamiento del secuenciador de Roche 454 GS FLX titanium está basado en la “pirosecuenciación”. Es decir, cada vez que la ADN polimerasa incorpora un nucleótido a la secuencia se libera una molécula de pirofosfato, iniciándose una serie de reacciones en cadena que culminan con la emisión de luz, al liberarse oxiluciferina por acción de la luciferasa (**Figura 2.12**). Las imágenes generadas por la luz emitida como consecuencia de la incorporación de nucleótidos en las secuencias son recogidas, sabiéndose que la cantidad de luz emitida es directamente proporcional a la cantidad incorporada de un determinado nucleótido. Finalmente las señales de luz recogidas son transformadas en la secuencia correspondiente y analizadas para eliminar posibles errores y secuencias de mala calidad. En este paso radican algunos de los inconvenientes de este sistema, ya que la lectura de homopolímeros (regiones de la secuencia con un número repetido del mismo nucleótido consecutivo), puede dar lugar a errores como consecuencia de la saturación de la lente. De cada $\frac{1}{4}$ de placa o TCA, es decir de los **experimentos 2 y 3**, se generan 3 tipos de archivos con extensión:

- **fna**: contiene todas las secuencias generadas en el 454.
- **qual**: archivo generado automáticamente por el secuenciador y que proporciona un primer informe sobre la eficiencia y calidad del proceso y las secuencias obtenidas en la pirosecuenciación.

- sff: es un archivo binario, que recoge conjuntamente la intensidad de las señales luminosas que aparecen durante la generación de las secuencias, las secuencias y la información sobre la calidad y eficiencia de todo el proceso. Este archivo es importante porque permite estimar la probabilidad de errores de todo el proceso de pirosecuenciación.

Estos archivos se utilizan para realizar los análisis bioinformáticos que permitirán conocer la diversidad de las archaeas metanogénicas presentes en las muestras, así como el efecto del tipo de dieta e, incluso, del animal a los que corresponde cada muestra. Las secuencias de las muestras se analizan mediante el software QIIME y se procesan siguiendo las recomendaciones de Caporaso et al., (2010). En resumen, QIIME permite clasificar las secuencias obtenidas por animal o tratamiento gracias a los “*barcodes*” incorporados en las mismas. Además, se eliminaron todas las secuencias inferiores a 300 pb y superiores a 500 pb. Las secuencias de los amplicones se clasifican usando como referencia la base de datos Greengenes que las alinea mediante PyNAST, un método que permite asignar las secuencias obtenidas usando como referencia una base de datos con secuencias conocidas (Greengenes). En comparación con otras bases de datos (ej: GenBank), Greengenes tiene la ventaja de que está preparada para evitar la presencia de quimeras. Una vez alineadas las secuencias, se construye un árbol filogenético (**Figura 3.5**) y se calculan las distancias filogenéticas mediante el método UniFrac, una herramienta que permite comparar online la diversidad microbiana de las poblaciones microbianas presentes en las muestras problema en un contexto filogenético.

Capítulo 3

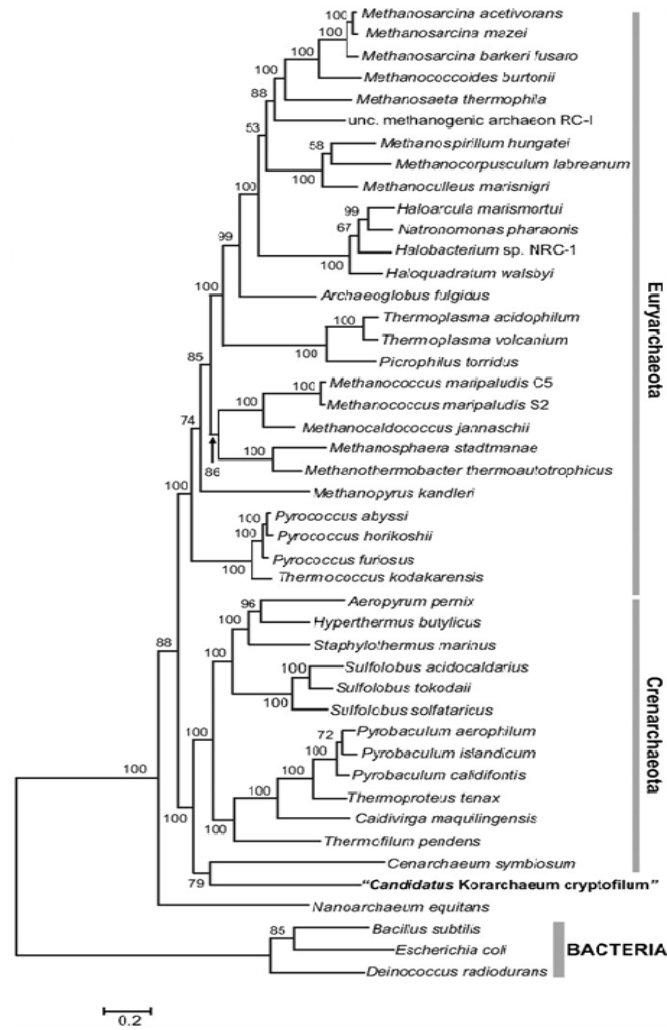


Figura 3.5. Ejemplo de árbol filogenético construido a partir de secuencias de amplicones obtenidas con el 454 GS FLX titanium.

A partir del árbol de distancias filogenéticas, se generan resúmenes de los datos obtenidos en cuanto a proporciones de los distintos grupos taxonómicos en las muestras, PCoA plots basados en distancias UniFrac (**Figura 3.6**).

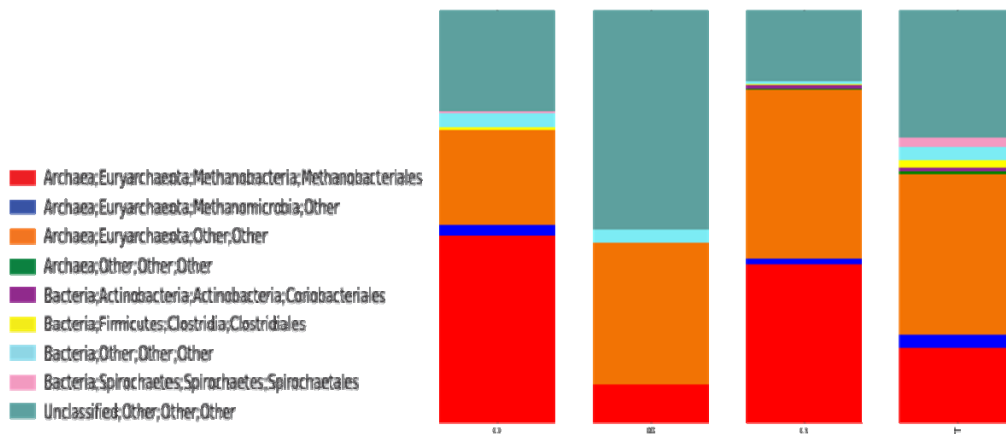


Figura 3.6. Ejemplo de proporciones de los distintos grupos taxonómicos generados a partir de un dendrograma.

Para asignar OTUs (Operational Taxonomic Unit) se utilizó, como criterio, una similitud mínima del 97% con las secuencias de la base de datos de referencia. Se detectan quimeras y otros posibles errores analíticos, derivados de la pirosecuenciación utilizando el software Mothur (Mothur v.1.23.2. 64 bit para Windows7). Es importante tener en cuenta y eliminar estos posibles errores derivados del proceso de pirosecuenciación, ya que el uso de una base de datos de referencia inadecuada y la presencia de quimeras, pueden dar lugar a una sobreestimación del número de OTUs y, por tanto, de la diversidad presente en el ecosistema ruminal.

3.5. TRATAMIENTO ESTADÍSTICO

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

- Modelo lineal general (GLM) univariante. Se empleó para el análisis conjunto de 2 factores y su interacción. Mediante este análisis se estudió el efecto del del tipo de bloque, el nivel de sustitución de concentrado por bloque y de la interacción de ambos factores sobre los parámetros de fermentación ruminal, producción de metano y abundancia de bacterias totales y metanogénicas en la **publicación 1**.

- Modelo lineal general (GLM) con medidas repetidas en el tiempo. En las publicaciones 2 y 3 se utiliza para analizar los efectos del tipo de dieta sobre los parámetros de fermentación ruminal, digestibilidad de nutrientes, balance de energía y nitrógeno, producción de metano y abundancia de bacterias totales y metanogénicas.

Capítulo 3

Cuando existían diferencias significativas ($P < 0,05$) debidas a cualquiera de los factores analizados, mediante alguno de los modelos mencionados anteriormente, se realizó una comparación entre medias utilizando un test de comparaciones múltiples post-hoc: el de Tukey para los datos que aparecen en la **publicación 1** y el DMS para los datos que aparecen en las **publicaciones 2 y 3**.

Capítulo 4

Resultados

Capítulo 4

El objetivo general de este trabajo de Tesis Doctoral es incorporar, en la dieta de rumiantes, desechos de invernaderos (tomate y pepino), como alternativa a los cereales. Los resultados obtenidos se incluyen en las publicaciones 1, 2, 3 y 4. Adicionalmente se resumen a continuación los resultados no incluidos en dichas publicaciones.

La sustitución parcial del concentrado por bloques multinutrientes, que contienen destríos de tomate y pepino procedentes de su cultivo en invernadero, no afectó de manera significativa ($P \geq 0,061$) a la digestibilidad de los nutrientes en cabras en lactación (**Tabla 4.1**) aunque los resultados obtenidos en cabras no productivas apuntan a una reducción de la digestibilidad de la MS, MO y EE ($P \leq 0,049$) cuando se reemplazó la mitad del concentrado por bloques multinutrientes. Además, e independientemente del tipo de bloque suministrado, la digestibilidad del EE y de la PB fue mayor (20 y 6%, respectivamente), y menor la de FND y FAD (7 y 17%, respectivamente), en cabras lactantes, comparadas con las no productivas.

Resultados

Tabla. 4.1. Digestibilidad aparente de nutrientes (g / g) en cabras en mantenimiento y en lactación alimentadas con las dietas experimentales.

	<i>Mantenimiento</i> ¹						<i>Lactación</i> ²					
	AC	ACT	ACC	ACB	EEM ³	P-valor	AC	ACT	ACC	ACB	EEM ³	P-valor
MS	0,68 ^b	0,62 ^a	0,64 ^a	0,67 ^{ab}	0,003	0,022	0,69	0,68	0,67	0,69	0,009	0,530
MO	0,71 ^b	0,66 ^a	0,67 ^a	0,70 ^{ab}	0,003	0,021	0,72	0,71	0,69	0,71	0,009	0,562
EE	0,68 ^b	0,58 ^a	0,63 ^{ab}	0,55 ^a	0,014	0,049	0,80	0,73	0,74	0,75	0,017	0,061
PB	0,72	0,70	0,72	0,73	0,005	0,802	0,78	0,76	0,76	0,77	0,009	0,322
FND	0,59	0,60	0,57	0,59	0,006	0,939	0,54	0,55	0,54	0,57	0,011	0,904
FAD	0,56	0,55	0,57	0,58	0,007	0,923	0,46	0,46	0,47	0,49	0,016	0,889

¹AC = Heno de alfalfa (25,6 g / kg PV^{0,75} / d) y concentrado (25,6 g / kg PV^{0,75} / d); ACT = Heno de alfalfa (25,6 g / kg PV^{0,75} / d), concentrado (12,8 g / kg PV^{0,75} / d) y bloque de tomate (15,5 g / kg PV^{0,75} / d); ACC = Heno de alfalfa (25,6 g / kg PV^{0,75} / d), concentrado (12,8 g / kg PV^{0,75} / d) y bloque de pepino (13,7 g / kg PV^{0,75} / d); ACB = Heno de alfalfa (25,6 g / kg PV^{0,75} / d), concentrado (12,8 g / kg PV^{0,75} / d) y bloque de cebada (10,6 g / kg PV^{0,75} / d). ²AC = 1000 g heno de alfalfa y 1000 g concentrado; ACT = 1000 g heno de alfalfa, 650 g concentrado, y 231,5 ± 68,8 g bloque de tomate; ACC = 1000 g heno de alfalfa, 650 g concentrado, y 239 ± 58,9 g bloque de pepino; ACB = 1000 g heno de alfalfa, 650 g concentrado, y 223 ± 87,6 g bloque de cebada (en base a materia fresca). ³EEM= Error Estándar de la Media.

Capítulo 4

En cabras no productivas, alimentadas con dietas que incluían bloques multinutrientes, se observó una menor ($P \leq 0,46$) ingesta, balance y N digestible especialmente cuando se usó la dieta que contenía bloque de cebada (**Tabla 4.2**). En cabras en lactación sólo se observó una tendencia ($P = 0,077$) hacia menores valores de N digestible ingerido. Por otro lado, la utilización de dietas que incluían bloques con destríos de invernaderos en cabras en lactación promovió una menor excreción de N en orina ($P = 0,037$), mientras que en cabras en mantenimiento tendieron a incrementar los valores de la misma ($P = 0,080$) con las dietas que incluían bloques. Aunque los balances de N fueron mayores en cabras en lactación que en cabras en mantenimiento, la cantidad de N retenido por los animales fue similar a pesar de su distinto estadio fisiológico.

En cuanto al efecto de la sustitución parcial del concentrado por bloques multinutrientes sobre el balance energético (**Tabla 4.2**), en animales productivos y no productivos, se han observado algunas diferencias ($P \leq 0,038$) pero, en ambos casos, no hubo ($P \geq 0,082$) cambios en la energía metabolizable. El consumo de energía de los animales alimentados con las dietas ACT, ACC y ACB fue ligeramente inferior comparado con la dieta control, sobre todo en animales en mantenimiento. Tanto en cabras en mantenimiento como en lactación alimentadas con dietas que incluían bloques multinutrientes, el aporte en energía digestible era menor ($P \leq 0,026$) que con la dieta control.

Tabla. 4.2. Balance de nitrógeno y energía en cabras en mantenimiento y en lactación alimentadas con las dietas experimentales.

	<i>Mantenimiento</i> ¹						<i>Lactación</i> ²					
	AC	ACT	ACC	ACB	EEM ³	<i>P</i> -valor	AC	ACT	ACC	ACB	EEM ³	<i>P</i> -valor
Peso vivo (PV), kg	31,8	32,7	31,6	32,4	3,05	0,310	38,6	38,7	40,3	40,2	1,79	0,411
PV ^{0,75}	13,3	13,6	13,3	13,5	0,951	0,270	15,5	15,5	16,0	15,9	0,54	0,402
g / kg PV ^{0,75}												
N ingerido	1,28 ^b	1,23 ^{ab}	1,31 ^b	1,10 ^a	0,054	0,042	3,25	3,12	3,01	3,10	0,13	0,384
N excretado en heces	0,354	0,359	0,360	0,286	0,012	0,074	0,730	0,760	0,737	0,704	0,066	0,922
N excretado en orina	0,592	0,632	0,704	0,630	0,028	0,080	1,51 ^b	1,31 ^a	1,32 ^a	1,40 ^{ab}	0,064	0,037
N digestible ⁴	0,930 ^b	0,869 ^{ab}	0,949 ^b	0,814 ^a	0,041	0,046	2,52	2,36	2,28	2,40	0,073	0,077
Balance N ⁵	0,339 ^b	0,237 ^{ab}	0,245 ^{ab}	0,184 ^a	0,015	0,035	1,01	1,05	0,954	0,997	0,054	0,961
Utilización N, %												
N digestible / N ingerido	72,4	70,3	72,0	73,4	0,495	0,801	77,9	75,8	75,5	77,5	0,92	0,322
Balance N / N digestible	35,2 ^b	28,0 ^{ab}	25,4 ^{ab}	20,5 ^a	0,215	0,049	39,7	43,9	41,1	41,4	1,92	0,740
MJ / kg of PV ^{0,75}												
Energía ingerida	0,860	0,820	0,828	0,740	0,025	0,419	1,93 ^b	1,80 ^a	1,77 ^a	1,79 ^a	0,060	0,029
Energía excretada en heces	0,254 ^b	0,281 ^b	0,283 ^b	0,235 ^a	0,008	0,038	0,567	0,569	0,543	0,532	0,038	0,517
Energía excretada en orina	0,040	0,037	0,039	0,034	0,003	0,924	0,080 ^b	0,070 ^a	0,074 ^a	0,075 ^a	0,004	0,008
Energía digestible ⁶	0,606 ^b	0,539 ^{ab}	0,546 ^{ab}	0,505 ^a	0,018	0,024	1,37 ^b	1,23 ^a	1,23 ^a	1,25 ^a	0,040	0,026
Energía excretada en CH ₄ ⁷	0,055 ^b	0,039 ^a	0,049 ^b	0,047 ^b	0,002	0,033	0,110 ^b	0,072 ^a	0,067 ^a	0,080 ^a	0,004	<0,001
Energía metabolizable ⁸	0,512	0,462	0,458	0,424	0,015	0,082	1,18	1,09	1,09	1,10	0,033	0,575
Utilización de energía, %												
Energía digestible / Energía ingerida	70,5	65,8	65,8	68,1	0,380	0,078	70,7	68,7	69,2	70,3	0,81	0,085
Energía metabolizable / Energía ingerida	59,6	56,4	55,2	57,2	0,558	0,054	60,8	60,7	61,2	61,6	0,87	0,937
Energía metabolizable / Energía digestible	84,4 ^{ab}	85,5 ^b	83,8 ^a	84,0 ^{ab}	0,475	0,040	85,9 ^a	88,4 ^b	88,3 ^b	87,5 ^{ab}	0,28	0,047

Capítulo 4

¹AC = Heno de alfalfa (25,6 g / kg PV^{0,75} / d) y concentrado (25,6 g / kg PV^{0,75} / d); ACT = Heno de alfalfa (25,6 g / kg PV^{0,75} / d), concentrado (12,8 g / kg PV^{0,75} / d) y bloque de tomate (15,5 g / kg PV^{0,75} / d); ACC = Heno de alfalfa (25,6 g / kg PV^{0,75} / d), concentrado (12,8 g / kg PV^{0,75} / d) y bloque de pepino (13,7 g / kg PV^{0,75} / d); ACB = Heno de alfalfa (25,6 g / kg PV^{0,75} / d), concentrado (12,8 g / kg PV^{0,75} / d) y bloque de cebada (10,6 g / kg PV^{0,75} / d). ²AC = 1000 g heno de alfalfa y 1000 g concentrado; ACT = 1000 g heno de alfalfa, 650 g concentrado, y 231,5 ± 68,8 g bloque de tomate; ACC = 1000 g heno de alfalfa, 650 g concentrado, y 239 ± 58,9 g bloque de pepino; ACB = 1000 g heno de alfalfa, 650 g concentrado, y 223 ± 87,6 g bloque de cebada (en base a materia fresca). ³EEM= Error Estándar de la Media. ⁴N digestible = N ingerido –N excretado en heces. ⁵Balance N = N digestible –N excretado en orina. ⁶Energía digestible = energía ingerida – energía excretada en heces. ⁷Energía excretada en CH₄ = 0,890 MJ/mol de CH₄ (Newbold et al., 2007). ⁸Energía metabolizable = energía digestible – energía excretada en orina – energía excretada en CH₄.

En relación a la fermentación ruminal, la sustitución parcial de concentrado por bloques multinutrientes no produjo ($P \geq 0,108$) cambios significativos en el pH. Sin embargo, la concentración en N-amoniaco del rumen de cabras en lactación alimentadas con dietas que incluían bloques con tomate y pepino fue menor ($P = 0,003$) que con las dietas AC y ACB. La concentración de AGVs en rumen aumenta ($P = 0,001$) cuando el concentrado se sustituye por bloques de tomate y pepino, en cabras no productivas, mientras que se mantiene (dieta ACC) o disminuye ligeramente ($P < 0,001$; dieta ACT) en cabras en lactación. Los animales alimentados con la dieta ACC, en mantenimiento y en lactación, presentaron la mayor ($P \leq 0,047$) síntesis de N microbiano y de AGVs, en comparación con las demás dietas. Además, la concentración en AGVs totales fue mayor en cabras en lactación que en mantenimiento. En cuanto al efecto de la sustitución parcial del concentrado por bloques multinutrientes sobre las proporciones molares de AGVs individuales (**Tabla 4.3**), en animales productivos y no productivos, varían ($P \leq 0,018$) dependiendo de la dieta suministrada.

El efecto de las dietas ensayadas sobre la producción de metano (**Tabla 4.4**) fue diferente ($P \leq 0,028$) cuando se comparan animales no productivos y productivos. En cabras en mantenimiento alimentadas con la dieta ACT se produjo una reducción de las emisiones de metano de aproximadamente 37% en comparación con la dieta control. En cabras en lactación fueron las dietas que incluían bloques con destriós de invernadero y cebada las que promovían descensos en la producción de metano de 39 y 29%, respectivamente, en comparación con la dieta control. En cuanto al tamaño de la comunidad de bacterias totales y de metanogénicas, los valores obtenidos mediante PCR cuantitativa, se situaron en el mismo rango en cabras en mantenimiento y en lactación, aunque se observó un aumento significativo ($P = 0,015$) de las arqueas metanogénicas en el rumen de cabras en mantenimiento alimentadas con las dietas ACT y ACC, en comparación con la dieta control mientras que en cabras en lactación no se observó ningún efecto de la dieta en este aspecto.

En cuanto a los efectos del remplazamiento parcial del concentrado por bloques multinutrientes sobre la diversidad de metanogénicas en el rumen, podemos adelantar resultados preliminares (**Figuras 4.1 y 4.2**), pero sin establecer ningún tipo de conclusiones, ya que estamos a la espera de los resultados de los nuevos análisis realizados para solucionar los problemas encontrados. Fundamentalmente fueron una gran cantidad de secuencias cortas y artefactos, que hicieron que se perdiera la

Capítulo 4

similaridad en las proporciones de las secuencias obtenidas por cada tratamiento (**Figura 4.1 A**). Todo esto posiblemente como consecuencia de problemas técnicos durante la realización de la PCR en emulsión. Así, dentro del dominio *Arquea*, el phyla *Euryarchaeota* (**Figura 4.1 A**) fue el más abundante en nuestros animales (71-95%). Sin embargo, en cabras en lactación alimentadas con bloques de tomate y cebada, y donde el número de secuencias viables obtenidas fue bajo (121 y 32, respectivamente), la proporción de *Euryarchaeota* fue más baja (60 y 44%, respectivamente). Por otro lado, una gran proporción de estas secuencias pertenecientes al phyla *Euryarchaeota* no pudo ser clasificada más allá del nivel de clase (23-65%), siendo este porcentaje ligeramente mayor en cabras en mantenimiento (**Figura 4.1 B**). Además, una proporción significativa de las secuencias no pudo ser identificada (3-57%), aunque estos porcentajes fueron especialmente altos en cabras en lactación alimentadas con las dietas ACT y ACB (**Figura 4.1 A**).

De forma general, la clase más dominante fue *Methanobacteria* (23-56%) y la menos abundante *Methanomicrobia* (1-11%)(**Figura 4.1 B**). El orden *Methanobacteriales* fue el más abundante (23-56%), siendo el orden *Methanomicrobiales* (2-10%) y *Methanosarcinales* (0,1-5%) los menos abundantes (**Figura 4.1 C**). Además, estos dos últimos órdenes sólo estuvieron presentes en cabras canuladas alimentadas con bloques; presentando la dieta ACT y ACC la mayor proporción de *Methanomicrobiales* (10%) y *Methanosarcinales* (5%), respectivamente. Por otro lado, la familia *Methanobacteriaceae* (24-56%) fue la más dominante (**Figura 4.2 A**). Además, las familias *Methanomicrobiaceae* (2-10%) y *Methanosarcinaceae* (0,1-5%) fueron las menos abundantes y sólo estuvieron presentes en cabras en mantenimiento alimentadas con bloques.

El género *Methanobrevibacter* (23-49%) fue el más abundante (**Figura 4.2 B**). Dentro de los géneros menos abundantes se encontraron *Methanosphaera*, *Methanomicrobium* y *Methanomicrococcus* (0,9-7%, 2-9,5% y 0,1-4,5%, respectivamente). Así, *Methanosphaera* fue más abundante en cabras alimentadas con la dieta AC, tanto en mantenimiento como en lactación (5-7%). El género *Methanomicrobium* sólo estuvo presente en cabras en mantenimiento alimentadas con bloques, siendo la dieta ACT la que presentó una mayor proporción (9,5%). Por último, el género *Methanomicrococcus* sólo estuvo presente en proporciones significativas en cabras en mantenimiento alimentadas con bloque de pepino (4,5%).

Tabla. 4.3. Parámetros de fermentación ruminal y flujo de nitrógeno microbiano y eficiencia en cabras en mantenimiento y en lactación alimentadas con las dietas experimentales.

	<i>Mantenimiento</i> ¹						<i>Lactación</i> ²					
	AC	ACT	ACC	ACB	EEM ³	<i>P</i> -valor	AC	ACT	ACC	ACB	EEM ³	<i>P</i> -valor
pH	6,94	7,05	7,09	7,09	0,024	0,108	6,94	7,00	6,93	6,91	0,036	0,391
NH ₃ -N, mg / 100 mL	16,4	15,6	16,3	16,0	0,483	0,865	28,1 ^b	18,2 ^a	18,5 ^a	25,3 ^b	0,497	0,003
AGVs totales, mmol / L mol / 100 mol	66,9 ^a	80,3 ^b	82,2 ^b	67,2 ^a	2,011	0,001	149 ^c	109 ^b	161 ^c	85,6 ^a	2,62	< 0,001
Acetato	65,1	67,5	69,0	67,3	0,437	0,054	67,6 ^b	65,2 ^a	65,9 ^a	65,5 ^a	0,440	0,033
Propionato	13,0 ^a	17,4 ^c	15,1 ^b	16,4 ^{bc}	0,098	< 0,001	12,8	13,3	15,2	12,5	0,297	0,087
Isobutirato	3,39 ^b	4,20 ^b	3,37 ^{ab}	1,81 ^a	0,114	0,018	2,19 ^a	3,04 ^b	2,23 ^a	3,32 ^b	0,168	0,005
Butirato	12,8 ^b	5,18 ^a	6,59 ^a	9,46 ^{ab}	0,309	0,002	13,9	14,2	13,0	13,8	0,276	0,495
Isovalerato	4,14	4,33	4,11	3,67	0,089	0,055	2,43 ^a	3,04 ^b	2,71 ^a	3,61 ^b	0,125	0,001
Valerato	1,59	1,46	1,85	1,41	0,118	0,482	1,07	1,22	0,94	1,26	0,034	0,070
Acetato:propionato	5,03 ^c	3,89 ^a	4,58 ^{bc}	4,12 ^b	0,036	< 0,001	5,35	5,01	4,48	5,44	0,152	0,269
Flujo de N microbiano, g / d	8,70 ^b	6,72 ^a	9,01 ^b	8,36 ^b	0,51	0,030	16,2 ^b	13,1 ^a	18,9 ^c	15,4 ^b	1,00	0,047
EMNS ⁴ , g / kg OMAFR	32,8	27,9	36,6	35,7	1,42	0,063	24,2 ^b	21,1 ^a	30,8 ^c	24,9 ^b	1,03	0,044

¹AC = Heno de alfalfa (25,6 g / kg PV^{0,75} / d) y concentrado (25,6 g / kg PV^{0,75} / d); ACT = Heno de alfalfa (25,6 g / kg PV^{0,75} / d), concentrado (12,8 g / kg PV^{0,75} / d) y bloque de tomate (15,5 g / kg PV^{0,75} / d); ACC = Heno de alfalfa (25,6 g / kg PV^{0,75} / d), concentrado (12,8 g / kg PV^{0,75} / d) y bloque de pepino (13,7 g / kg PV^{0,75} / d); ACB = Heno de alfalfa (25,6 g / kg PV^{0,75} / d), concentrado (12,8 g / kg PV^{0,75} / d) y bloque de cebada (10,6 g / kg PV^{0,75} / d). ²AC = 1000 g heno de alfalfa y 1000 g concentrado; ACT = 1000 g heno de alfalfa, 650 g concentrado, y 231,5 ± 68,8 g bloque de tomate; ACC = 1000 g heno de alfalfa, 650 g concentrado, y 239 ± 58,9 g bloque de pepino; ACB = 1000 g heno de alfalfa, 650 g concentrado, y 223 ± 87,6 g bloque de cebada (en base a materia fresca). ³ EEM= Error Estándar de la Media. ⁴ Eficiencia de síntesis de N microbiano; OMAFR = materia orgánica aparentemente fermentada en el rumen (65% de la MO digestible; ARC, 1984).

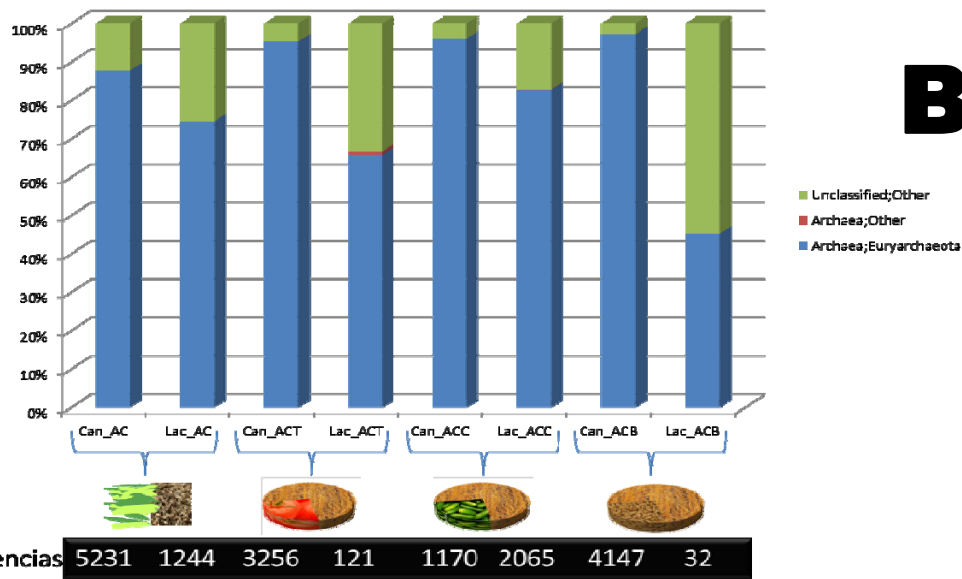
Capítulo 4

Tabla. 4.4. Emisiones de metano y abundancia de bacterias y metanogénicas en el rumen de cabras canuladas en mantenimiento y en lactación alimentadas con las dietas experimentales.

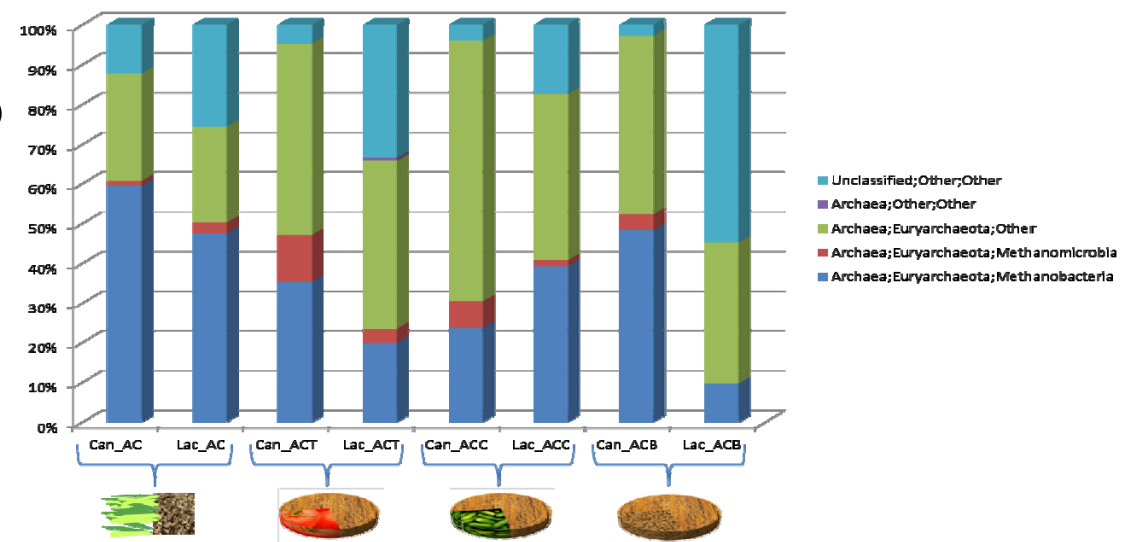
	<i>Mantenimiento</i> ¹						<i>Lactación</i> ²					
	AC	ACT	ACC	ACB	EEM ³	<i>P</i> -valor	AC	ACT	ACC	ACB	EEM ³	<i>P</i> -valor
Producción de metano												
CH ₄ L / d	18,3 ^b	13,5 ^a	16,2 ^{ab}	16,0 ^{ab}	0,848	0,028	42,4 ^c	27,8 ^a	26,9 ^a	32,0 ^b	0,732	< 0,001
CH ₄ L / kg PV	0,587 ^b	0,420 ^a	0,522 ^{ab}	0,500 ^{ab}	0,028	0,020	2,77 ^c	1,81 ^a	1,71 ^a	2,03 ^b	0,095	< 0,001
CH ₄ L / kg MSI	29,3 ^c	18,5 ^a	25,4 ^b	28,2 ^c	0,330	< 0,001	28,2 ^c	17,4 ^a	17,2 ^a	19,7 ^b	0,558	< 0,001
log copias gen / g MF												
Bacteria	11,2	11,4	11,4	11,2	0,058	0,072	11,5	11,4	11,5	11,4	0,092	0,423
Metanogénicas	8,48 ^a	8,86 ^b	8,85 ^b	8,49 ^a	0,050	0,015	9,04	8,83	8,91	8,86	0,095	0,441

¹AC = Heno de alfalfa (25,6 g / kg PV^{0,75} / d) y concentrado (25,6 g / kg PV^{0,75} / d); ACT = Heno de alfalfa (25,6 g / kg PV^{0,75} / d), concentrado (12,8 g / kg PV^{0,75} / d) y bloque de tomate (15,5 g / kg PV^{0,75} / d); ACC = Heno de alfalfa (25,6 g / kg PV^{0,75} / d), concentrado (12,8 g / kg PV^{0,75} / d) y bloque de pepino (13,7 g / kg PV^{0,75} / d); ACB = Heno de alfalfa (25,6 g / kg PV^{0,75} / d), concentrado (12,8 g / kg PV^{0,75} / d) y bloque de cebada (10,6 g / kg PV^{0,75} / d). ²AC = 1000 g heno de alfalfa y 1000 g concentrado; ACT = 1000 g heno de alfalfa, 650 g concentrado, y 231,5 ± 68,8 g bloque de tomate; ACC = 1000 g heno de alfalfa, 650 g concentrado, y 239 ± 58,9 g bloque de pepino; ACB = 1000 g heno de alfalfa, 650 g concentrado, y 223 ± 87,6 g bloque de cebada (en base a materia fresca). ³EEM= Error Estándar de la Media.

A



B



C

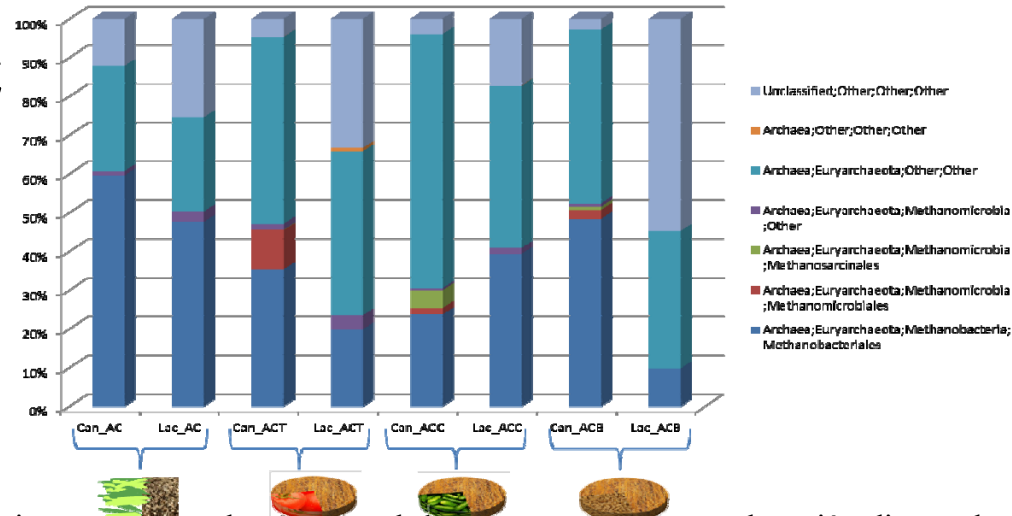


Figura 4.1. Diversidad de metanogénicas en el rumen de cabras canuladas en mantenimiento y en lactación alimentadas con las dietas experimentales; **A:** a nivel de phyla; **B:** a nivel de clase; **C:** a nivel de orden.

Capítulo 4

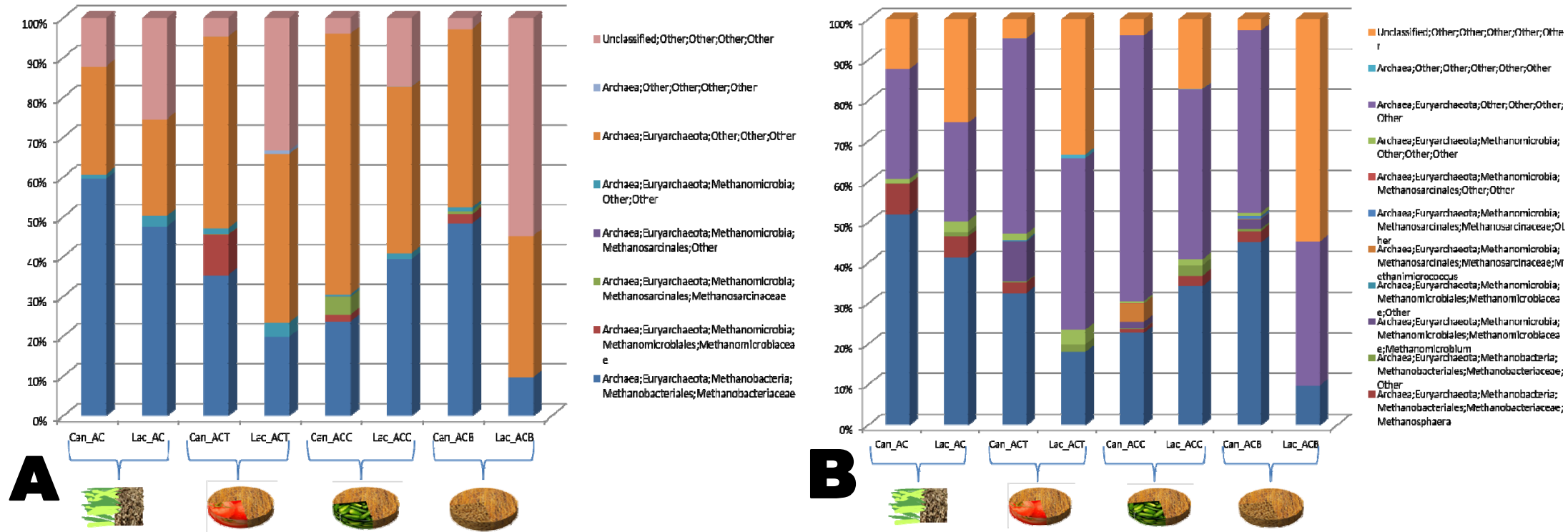


Figura 4.2. Diversidad de metanogénicas en el rumen de cabras canuladas en mantenimiento y en lactación alimentadas con las dietas experimentales;

A: a nivel de familia; **B:** a nivel de género.

Tabla 4.5. Composición en aminoácidos de los ingredientes de la dieta.

	Heno de alfalfa	Concentrado	Bloque Tomate	Bloque Pepino	Bloque Cebada
Aminoácidos totales ¹ , g/100g N total	56,1	57,0	20,3	19,1	16,2
AA, g/100 g AA totales					
Ácido Aspártico	5,53	6,42	6,40	3,90	3,18
Ácido Glutámico	8,33	16,1	22,2	18,6	15,9
Serina	5,37	4,13	4,08	4,64	5,19
Glicina	5,43	3,96	5,63	6,32	6,13
Histidina	3,55	3,25	3,47	3,54	3,20
Arginina	7,42	7,14	4,04	7,38	4,89
Treonina	5,54	3,59	5,29	4,42	5,66
Alanina	6,39	4,30	5,55	6,08	6,80
Prolina	8,00	3,97	4,48	4,79	5,38
Tirosina	4,54	3,34	3,70	3,99	4,19
Valina	5,78	4,80	4,77	5,79	5,22
Metionina	3,16	7,46	4,98	6,37	8,01
Cisteína	3,32	10,9	3,97	3,42	3,76
Isoleucina	5,03	3,96	4,61	4,76	4,83
Leucina	8,53	6,31	5,86	6,30	6,45
Fenilalanina	5,96	4,65	4,99	4,77	5,25
Lisina	8,11	5,76	6,00	4,93	5,93
EAA ²	53,1	46,9	44,0	48,3	49,4
NEAA ³	46,9	53,1	56,0	51,7	50,6

²Sin triptófano. ³EAA = aminoácidos esenciales: treonina, arginina, valina, metionina, isoleucina, leucina, fenilalanina, lisina and histidina. ⁴NEAA = aminoácidos no esenciales: alanina, ácido aspártico, ácido glutámico, glicina, prolina, serina, tirosina y cisteína.

En cuanto al efecto de sustituir el 35% del concentrado por bloques multinutrientes sobre la composición en aminoácidos de la leche (**Tabla 4.6**) se observa una reducción del contenido en fenilalanina ($P = 0,039$) en animales alimentados con las dietas que incluían bloques de tomate y pepino. La dieta con bloque de pepino también redujo ($P = 0,042$) el contenido en ácido glutámico en la leche. El contenido en aminoácidos esenciales se redujo ($P = 0,062$) en aquellos animales que consumían las dietas en las que se reemplazó el concentrado por bloques de tomate y cebada.

Capítulo 4

Tabla 4.6. Composición en aminoácidos de la leche de cabras alimentadas con las dietas experimentales¹ (n = 8).

Item	Dieta				EEM	P-valor
	AC	ACT	ACC	ACB		
N total, mg/g MS	40,6	40,4	40,0	39,6	1,02	0,903
Aminoácidos totales, g/100g N ²	84,0	84,6	88,6	81,7	1,51	0,082
AA, g/100 g AA						
Ácido aspártico	6,38	6,69	5,96	6,71	0,213	0,283
Ácido Glutámico	18,5 ^{ab}	18,6 ^{ab}	17,6 ^a	19,6 ^b	0,171	0,042
Serina	4,47	4,64	4,52	4,64	0,055	0,647
Glicina	1,72	1,75	1,77	1,78	0,034	0,805
Histidina	3,57	3,59	3,66	3,68	0,042	0,729
Arginina	2,50	2,79	2,66	2,44	0,065	0,483
Treonina	4,62	4,63	4,65	4,89	0,074	0,559
Alanina	3,10	3,15	3,30	3,18	0,118	0,584
Prolina	8,20	8,28	8,11	8,42	0,217	0,804
Tirosina	4,61	4,70	4,80	4,73	0,154	0,666
Valina	5,54	5,49	5,45	5,73	0,143	0,791
Metionina	8,15	7,65	8,48	6,62	0,252	0,628
Cisteína	4,14	4,23	4,77	3,45	0,298	0,439
Isoleucina	4,38	4,31	4,40	4,47	0,028	0,584
Leucina	7,53	7,43	7,38	7,51	0,106	0,840
Fenilalanina	4,28 ^b	4,12 ^a	4,15 ^a	4,23 ^{ab}	0,057	0,039
Lisina	8,31	7,94	8,29	7,93	0,124	0,473
EAA ³	48,9	48,0	49,1	47,5	0,355	0,062
NEAA ⁴	51,1	52,0	50,9	52,5	0,355	0,062

¹AC = 1000 g heno de alfalfa y 1000 g concentrado; ACT = 1000 g heno de alfalfa, 650 g concentrado, y 231,5 ± 68,8 g bloque de tomate; ACC = 1000 g heno de alfalfa, 650 g concentrado, y 239 ± 58,9 g bloque de pepino; ACB = 1000 g heno de alfalfa, 650 g concentrado, y 223 ± 87,6 g bloque de cebada (en base a materia fresca). ²Sin triptófano. ³EAA = aminoácidos esenciales: treonina, arginina, valina, metionina, isoleucina, leucina, fenilalanina, lisina and histidina. ⁴NEAA = aminoácidos no esenciales: alanina, ácido aspártico, ácido glutámico, glicina, prolina, serina, tirosina y cisteína.

Publicación 1

Effect of the partial replacement of concentrate in ruminant diet with feed blocks including greenhouse wastes on in vitro ruminal fermentation, microbiota and methane production

M. Romero-Huelva, A. I. Martín-García, R. Nogales and E. Molina-Alcaide

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

(Enviado a Journal of Animal and Feed Science)

Capítulo 4

Summary. Our hypothesis is that partial replacement of cereals-based concentrates in ruminants diet with feed blocks including wastes from greenhouse horticulture could decrease feeding cost and environmental pollution without compromising ruminal fermentation. The aim of this work was to evaluate the effect of replacing 0, 50, 75 or 100% of cereals-based concentrate in diets based on alfalfa hay with feed blocks including barley grain or 650 g/kg fresh matter of greenhouse waste fruits (tomato, cucumber or a 1:1 mixture of tomato and cucumber) on the *in vitro* ruminal fermentation, methane production and abundances of total bacteria and methanogens. Four incubation runs were carried out in batch cultures of mixed rumen microorganisms with inoculum from goats. The type of feed-blocks did not show any effect ($P \geq 0.25$). However, the level of concentrate replacement with blocks affected ($P \leq 0.042$) the pH, CH₄ concentration, total gas, CH₄ and total VFA productions, acetate/propionate and CH₄/Total VFAs ratios and molar proportions of acetate and butyrate. The potential gas production and the degradation rate were also affected ($P < 0.001$) by the level of concentrate replacement but methanogens abundance was not affected ($P = 0.27$) although a trend ($P = 0.082$) to higher total bacteria abundance with 75% of concentrate replacement was observed. The replacement of concentrate with feed blocks modified ruminal fermentation, DM and NDF digestibility and had an antimethanogenic effect, being more pronounced with increasing levels of concentrate replacement with feed blocks. Further *in vivo* research should be done to study the effect of replacing 50% or 75% of concentrate with feed blocks on ruminal fermentation, nutrients utilization, products quality and methane production.

Keywords : concentrate, batch cultures, feed blocks, greenhouse wastes, methane production, rumen microorganisms.

Introduction

In Mediterranean countries pastures are scarce and poor quality especially in dry seasons. Concentrates are then necessary for feeding ruminant but they are mainly based on cereals, which prices are progressively increasing (FAO, 2010). Thus, there is a need to find alternative feedstuffs allowing to alleviate the dependence on imported and expensive cereals and, additionally, to reduce production costs and environmental problems (Morales et al., 2000; Ben Salem and Smith, 2008; Vasta et al., 2009). Methane emission from the enteric fermentation is of concern worldwide for its contribution to the accumulation of greenhouse gases in the atmosphere and to the loss of energy supply for the animal (Hook et al., 2010).

In the Mediterranean area, greenhouse culture accounts for 15% of total world horticulture production Spain being the main producer (MARM, 2009). This agricultural sector generates abundant fruit wastes, mainly tomato and cucumber, which have to be stored creating economic and environmental troubles. Some by-products from tomato processing industry such as tomato pulp and pomace have been previously evaluated as nutrient sources for ruminants (Fondevila et al., 1994; Denek and Can, 2006; Ben Salem and Znaidi, 2008), but to our knowledge there is little information on the nutritive value of tomato fruits (Ventura

et al., 2009) and data on the use of cucumber fruits in ruminant feeding are scanty.

High moisture in wastes is an inconvenient for their preservation and inclusion in animal feeding, but this limitation may be overcome by using feed blocks technology (Ben Salem and Nefzaoui, 2003). The objective of the present work was to study the effect of substituting different amounts of a cereal-based concentrate with feed blocks including 650 g/kg fresh matter of fruits of tomato, cucumber, a mixture of both fruits and barley grain on *in vitro* ruminal fermentation, methane production and total bacteria and methanogens abundances.

Materials and methods

Diets

A control diet (CO) composed of alfalfa hay and a commercial concentrate (35% wheat shorts, 16% barley, 12% sunflower meal, 10% corn shorts, 9% soybean hulls, 9% soybean meal, 5% corn grain, 2.20% quicklime, 0.45% fatty acid salts and 0.35% NaCl, 8,000 U.I./kg A vitamin and 1,600 U.I./kg D3 vitamin) in a 1:1 ratio was used. The experimental diets were formulated by replacing 50, 75 and 100% of the concentrate with feed blocks including wastes of tomato (diets T50, T75 and T100, respectively) cucumber (diets C50, C75 and C100, respectively), a mixture (1:1) of tomato and cucumber wastes (diets TC50,

TC75 and TC100, respectively) or barley (diets B50, B75 and B100, respectively). Formulated feed-blocks (Table 1) were hand-made following the procedure described in previous works of our group (Molina-Alcaide et al., 2009, 2010). Solid ingredients (wheat straw, barley and sunflower meal) were mixed with a liquid mixture composed of water, quicklime, salt, urea and wastes of tomato, cucumber or a mixture (1:1) of both and then heavily packed in aluminium mold. Tomato and cucumber wastes were collected at the Plant of Wastes Treatment Factory in Motril (Granada, Spain), homogenized using a commercial blender (DANAMIX Model TR330, Fordingbridge, UK) and kept at -20°C before used for feed blocks preparation. Compacted blocks were taken out from the mold and air-dried within three to eight days.

Table 1 Ingredients composition (g/kg dry matter) of feed blocks.

Item	Feed blocks*			
	T-FB	C-FB	TC-FB	B-FB
Barley	—	—	—	83
Tomato	129	—	50	—
Cucumber	—	69	42	—
Wheat straw	598	639	624	631
Quicklime	81	88	87	85
NaCl	49	52	51	51
Sunflower	97	104	101	102
Urea	35	36	34	37
Vitamin-mineral mixture†	11	12	11	11

*B-FB, T-FB, C-FB and TC-FB: barley, tomato, cucumber and tomato plus cucumber feed blocks, respectively.

†Contained (per kilogram): NaCl, 277 g; ash from the 2-stage dried olive cake, 270 g; CaH₄(PO₄)₂, 250 g; MgSO₄, 200 g; CuO, 184 mg; I, 25 mg; CoO, 8.5 mg; Se, 4 mg; ZnO, 2.28 mg; 83,500 IU of vitamin A; and 16,700 IU of vitamin D.

Animals

Three adult dry non-pregnant rumen-fistulated Granadina goats (46.9 ± 2.15 kg BW) were used as inoculum donors for the in vitro incubations. Animals were placed in individual boxes and had free access to water. Animals were fed alfalfa hay supplied to meet energy maintenance requirements (Aguilera et al., 1990). Animals' management and rumen content sampling were carried out by qualified personnel in accordance with the Spanish guidelines for experimental animal protection (Royal Decree 1201/2005 of October 10 on the protection of animals used for experimentation or other scientific purposes) in line with the European Convention for the Protection of Vertebrates used for Experimental and other Scientific Purposes (European Directive 86/609).

Experimental Procedure and Sampling

Batch cultures of mixed rumen micro-organisms were used to study the ruminal fermentation, gas and methane production and total bacteria and methanogens abundances promoted by control and experimental diets (Table 2) incubation. The experimental procedure was based on Theodorou et al. (1994) protocol with some modifications. Three identical 72 h incubation runs were carried out in three consecutive weeks. Rumen content from each goat was obtained before the morning feeding, immediately transported to the laboratory into thermal bottles, mixed and strained through four layers of cheesecloth into a warmed Erlenmeyer flask with an O₂-free headspace. The buffer solution of Goering and Van Soest, (1970) was previously prepared into an Erlenmeyer flask under a CO₂ stream and kept one hour with an O₂-free headspace after the resazurine colour turnover showed an O₂-free solution. Particle-free ruminal fluid was mixed with the buffer solution in a proportion 1:4 (vol/vol) at 39 °C under continuous flushing with CO₂. Buffered ruminal fluid (50 mL) was added into each bottle under CO₂ flushing. Bottles were sealed with butyl rubber stoppers and aluminium caps and placed in a water bath at 39 °C.

Serum bottles of 120 mL (Laboratorios Ovejero S.A., León, Spain) whose weight was previously recorded were used. In each incubation run triplicate samples (0.5 g dry matter, DM) of control and experimental diets, along with alfalfa hay used as a standard and blanks, were placed into the bottle and incubated. Pressure in the bottle headspace and volume of gas produced were measured at 2, 4, 6, 8, 12, 24, 48 and 72 h after inoculation using a Wide Range Pressure Meter (Spec Scientific LTD, Scottsdale, AZ, USA) and a calibrated glass syringe as described by Theodorou et al. (1994), respectively. After 24 and 72 h of incubation an aliquot of the gas produced was taken in a 10 mL vacuum tube (Venoject[®], Terumo Europe N.V., Leuven, Belgium) for CH₄ concentration analysis. After 24 h half of the bottles were swirled in ice to stop fermentation, and then uncapped to measure pH in the incubation medium with a pH-meter (Metrohm AG, Herisau, Switzerland). The weight of the bottle content was recorded and an aliquot (1 mL) was added to 1 mL of deproteinising solution (20 g of metaphosphoric acid and 4 g of crotonic acid, as internal standard, per litre of 0.5 M-HCl) for volatile fatty acid (VFA) analysis. The remaining content of bottles was lyophilized for DNA extraction and DM and NDF content analyses. The rest of the bottles were maintained for 72 h after inoculation and fermentation was stopped following a similar procedure to the one previously described for bottles incubated during 24 h.

Capítulo 4

Table 2 Chemical composition of experimental diets (g/kg dry matter).

	Diets*												
	CO	T50	T75	T100	C50	C75	C100	TC50	TC75	TC100	B50	B75	B100
DM, g/kg fresh matter	907	915	920	924	919	925	931	917	923	928	919	925	931
OM	898	872	859	847	869	855	841	870	857	843	872	860	847
Ether extract	20.6	15.1	12.3	9.6	14.8	11.9	9.0	14.9	12.0	9.1	14.8	11.8	8.9
NDF	462	488	502	515	483	494	505	488	501	514	492	507	522
ADF	259	294	311	328	291	308	324	294	311	328	296	315	333
ADL	56.7	62.3	65.1	67.9	62.3	65.1	67.9	62.6	65.6	68.6	63.3	66.6	70.0
Crude Protein	151	154	155	157	155	157	159	153	154	155	155	156	158
NSC†	264	215	190	165	216	192	168	215	190	165	211	185	159
GE, MJ/kg of DM	17.6	17.0	16.7	16.4	16.9	16.5	16.2	17.0	16.6	16.3	16.9	16.5	16.1
Condensed tannins													
Free	0.71	0.72	0.72	0.72	0.73	0.75	0.76	0.73	0.73	0.74	0.80	0.84	0.89
Fibre-bound	7.28	10.5	12.0	13.6	10.0	11.4	12.7	10.2	11.7	13.2	9.61	10.8	11.9
Protein-bound	1.04	1.12	1.16	1.19	1.13	1.17	1.21	1.12	1.16	1.20	1.10	1.13	1.16
Total‡	9.04	12.3	13.9	15.5	11.9	13.3	14.7	12.1	13.6	15.1	11.5	12.7	14.0

*CO: control diet; T50, T75, T100: diets including tomato feed blocks; C50, C75, C100: diets including cucumber feed blocks; TC50, TC75, TC100: diets including tomato and cucumber feed blocks; B50, B75, B100: diets including barley feed blocks; 50, 75, 100 suffix: increasing levels of green-houses wastes feed blocks inclusion in experimental diets. †Non structural carbohydrates calculated as: NSC: non structural carbohydrate calculated as OM-(EE+CP+NDF). ‡Calculated as free + fibre-bound + protein-bound tannins.

Assessment of microbial population size

The numbers of total bacteria and methanogens in samples of bottles content after 24 of incubation were quantified by quantitative real time PCR (qPCR). Freeze-dried samples were thoroughly mixed by physical disruption using a bead beater (Mini-bead Beater; BioSpec Products, Bartlesville, OK) before DNA extraction, which was performed from approximately 50 mg samples using the QIAamp DNA Stool Mini Kit (Qiagen Ltd, West Sussex, UK) following the manufacturer's instructions with a modification: a higher temperature (95 °C) was used for lysis incubation. The DNA samples were used as templates to quantify the copy numbers of 16S rRNA for bacteria, methyl coenzyme M reductase A (*mcrA*) gene for methanogens. The yield and purity of the extracted DNA were assessed using NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE). The 16S rRNA gene-targeted primer sets used in this study are showed in Table 3. Three replicates of each DNA extract were used and a negative control (sterile distilled water) was loaded on each plate run to screen for possible contamination and dimer formation and to set the background fluorescence for plate normalization. Real-time PCR was performed using an iQ5 multicolor Real-Time

PCR Detection System (BioRad, Laboratories Inc., Hercules, CA, USA). One µl of DNA extract was added to amplification reactions (25 µl) containing 0.2 µl of each primer (10 µM) and 12.5 µl of iQ SYBR Green Supermix (Biorad Laboratories Inc). Cycling conditions were 95 °C for 5 min; 40 cycles at 95 °C for 15 s, 60 °C for 30 s and 72 °C for 55 s; and a final extension at 72 °C for 1 min. The threshold cycle (i.e. the amplification cycle in which product formation exceeds background fluorescence) of each sample was determined during the exponential phase of amplification. All post run data analyses were performed using Bio Rad CFX Manager Software (version 1.6.541.1028). The absolute amount for each microbial group, expressed as the number of DNA copies/g of fresh matter, was determined using standards. The qPCR standards consisted of the plasmid pCR 4-TOPO (Invitrogen, Carlsbad, CA) with an inserted 16S or *mcrA* gene fragment corresponding to a conserved sequence of total bacteria or methanogenic archaea. The number of gene copies present in the plasmid extracts was calculated using the plasmid DNA concentration and the molecular mass of the vector with the insert. The concentrated plasmid was serially diluted (10-fold) to generate a standard curve.

Table 3 PCR primers used for all the molecular analyses.

Target group	Technique	Forward sequence	Reverse sequence	Ref.
Bacteria	qPCR	GTGSTGCAYGGYTGTCTGCA	ACGTCRTCCMCACCTTCCTC	Maeda <i>et al.</i> , 2003
Methanogens	qPCR	TTCGGTGGATCDCARAGRGC	GBARGTCGWAWCCGTAGAATCC	Denman <i>et al.</i> , 2007

Chemical analysis

Ground (1-mm) samples of ingredients and diets were analyzed for dry matter (DM), organic matter (OM), and ether extract (EE) according to the AOAC (2005). After N determination using a Leco TruSpec CN® (St. Joseph, MI, USA), crude protein (CP) was calculated multiplying by 6.25. The NDF and ADF were analyzed according to Van Soest et al. (1991) using an ANKOM Model 220 Fiber Analyzer (Macedon, NY, USA) with α -amylase for NDF analysis in concentrate samples and both NDF and ADF contents referred to ash-free weight. The ADL was determined by solubilisation of cellulose with 72% sulphuric acid. The energy content was determined using an oxygen bomb calorimeter (PARR 1356, Biometer®). Free, protein and fibre-bound condensed tannins were sequentially extracted and quantified following the procedure described by Perez-Maldonado and Norton, (1996). Condensed tannins from quebracho powder (Roy Wilson Dickson Ltd., Mold, U.K.) were used as a standard.

The CH₄ concentration was determined by gas chromatography (GC) using a HP Hewlett 5890, Packard Series II gas chromatograph (Waldbronn, Germany) equipped with a flame ionization detector (FID) and with a HP-INNOWAX crosslinked polyethylene glycol column (25 m x 0,2 mm x 0,2 μ m). The carrier gas was He and peaks were identified by comparison with a standard of known composition. A sample of 0.5 mL of gas was injected using a 1 mL Sample-Lock® syringe (Hamilton, Nevada, USA). Total and individual VFA were analyzed by gas chromatography following the methodology described by Isac et al. (1994).

Calculations and Statistical Analysis

The gas produced in batch cultures was adjusted to the expression: $y = A [1 - e^{-ct}]$ where y represents the cumulative gas production (mL), t the incubation time (h), A the asymptote (total gas; mL) and c the constant rate. The amount of VFA in the batch cultures bottles content after 24 h of incubation was corrected for the amount of VFA in the rumen liquid used as inoculum. The DM truly digested was calculated according to Van Soest et al. (1966) as: *True DM digestibility* = $(DM\ input - FND\ output)/DM\ input$, FND output being that analyzed in the residue after 24 h of incubation. The amount of CH₄ produced was calculated by multiplying the gas produced with its concentration in CH₄.

Data were analyzed by unvaried model using the GLM procedure of SPSS (IBM SPSS Statistics v.19, IBM Corp., Somers, NY). The linear model used for each dependent variable accounted for the effects of

feed block type (BT), substitution level of concentrate with feed blocks in the corresponding diet (SL) and BT \times SL interaction. Differences between individual experimental units (bottles) and between incubation runs were considered as random effects. Effects were considered significant at $P \leq 0.05$ and a trend when P -value is comprised between 0.05 and 0.1. Differences among means were tested using the Tukey comparison test.

Results

The type of block did not affect ($P \geq 0.25$) ruminal fermentation products and digestibility (Table 4). On the contrary, the level of concentrate replacement with feed blocks promoted differences in most of the determined parameters. Average pH values were higher ($P < 0.001$) for diets including blocks in comparison with the control one. The methane concentration decreased ($P < 0.001$) with levels of concentrate replacement $\geq 75\%$. Moreover, the productions of methane and fermentation gas decreased ($P < 0.001$) with the replacement of concentrate with feed blocks as it can be observed in Figure 1 as well. The CH₄/VFA ratio decreased ($P < 0.001$) with increasing levels of concentrate replacement as it was for the potential gas production (A) and the rate of degradation (c). Total VFA production decreased ($P = 0.042$) by concentrate replacement especially for the 100% of replacement. The acetate/propionate ratio and molar proportion of acetate increased ($P \leq 0.023$) for concentrate replacement $\geq 75\%$ with feed blocks. Nevertheless, the molar proportion of butyrate decreased ($P < 0.001$) by concentrate replacement $\geq 75\%$ with feed blocks. Apparent and true DM digestibility and NDF digestibility values decreased ($P < 0.001$) with increasing the level of concentrate replacement with feed blocks. Propionate, isobutyrate, isovalerate and valerate molar proportions were not affected ($P \geq 0.27$) by the level of concentrate replacement. No block type \times replacement level interaction ($P \geq 0.14$) was found for any of the analysed or calculated parameters.

Capítulo 4

Table 4 Effect of the type of feed block and the level of concentrate replacement on the ruminal fermentation parameters in batch cultures after 24 h of incubation.

	Block type*				Substitution level				SEM	P-value		
	T	C	TC	B	0	50	75	100		Block type (BT)	Substitution level (SL)	BT × SL
pH	6.68	6.68	6.69	6.68	6.61 ^a	6.66 ^b	6.68 ^c	6.71 ^d	0.002	0.74	<0.001	0.75
Gas, mL/g incubated DM	176	173	176	177	214 ^d	188 ^c	176 ^b	163 ^a	0.53	0.27	<0.001	0.81
CH ₄ , mL/ mL total gas	0.19	0.19	0.19	0.19	0.20 ^b	0.20 ^b	0.19 ^{ab}	0.17 ^a	0.001	0.99	<0.001	0.93
CH ₄ , (mL/ g incubated	34.0	33.3	33.8	33.9	42.2 ^d	37.5 ^c	33.5 ^b	30.2 ^a	0.25	0.89	<0.001	0.85
CH ₄ /VFA, mL/mmol	6.94	6.81	6.83	7.09	7.83 ^c	7.60 ^{bc}	6.74 ^{ab}	6.40 ^a	0.12	0.91	<0.001	0.99
A, mL	104	104	105	107	120 ^c	110 ^b	105 ^a	100 ^a	0.63	0.51	<0.001	0.99
c, h ⁻¹	0.080	0.077	0.077	0.074	0.092 ^c	0.083 ^b	0.078 ^{ab}	0.071 ^a	0.001	0.58	<0.001	0.99
Total VFA, mmol	2.47	2.48	2.50	2.40	2.71 ^b	2.49 ^{ab}	2.52 ^{ab}	2.37 ^a	0.041	0.93	0.042	0.99
VFA, mmol/100 mol												
Acetate	70.9	71.6	71.2	71.4	69.7 ^a	70.1 ^a	71.8 ^b	71.8 ^b	0.17	0.74	<0.001	0.97
Propionate	16.5	16.4	16.5	16.4	16.6	16.4	16.4	16.5	0.057	0.80	0.33	0.98
Iso-butyrate	0.81	0.82	0.76	0.82	0.81	0.79	0.77	0.85	0.024	0.83	0.65	0.14
Butyrate	9.38	9.01	9.22	9.30	10.7 ^c	10 ^{bc}	9.10 ^{ab}	8.58 ^a	0.16	0.93	<0.001	0.99
Iso-valerate	1.36	1.33	1.27	1.21	1.40	1.46	1.12	1.30	0.063	0.92	0.31	0.99
Valerate	1.04	0.84	0.94	0.96	0.74	1.15	0.76	0.93	0.086	0.94	0.27	0.99
Acetate/propionate	4.29	4.38	4.32	4.37	4.19 ^a	4.28 ^{ab}	4.37 ^b	4.37 ^b	0.022	0.69	0.023	0.97
Apparent DM digestibility,	0.34	0.31	0.33	0.34	0.45 ^c	0.38 ^b	0.32 ^a	0.29 ^a	0.006	0.67	<0.001	0.72
True DM digestibility [†] , g/g	0.68	0.69	0.68	0.69	0.75 ^d	0.72 ^c	0.69 ^b	0.65 ^a	0.002	0.25	<0.001	0.83
NDF digestibility, g/g	0.36	0.38	0.37	0.39	0.45 ^d	0.42 ^c	0.39 ^b	0.32 ^a	0.003	0.29	<0.001	0.87

*Feed blocks including tomato (T), cucumber (C), a mixture of tomato and cucumber (TC) and barley (B). [†]Calculated as proposed by van Soest et al. (1966): true digested DM = (DM input – FND output)/DM input, FND output being that analyzed in the residue after 24 h incubation.

The numbers of bacteria and methanogens (Table 5) were not affected ($P \geq 0.43$) by the type of feed block. The level of concentrate replacement with feed blocks did not affect ($P \geq 0.27$) the population size of methanogens. However, a trend ($P = 0.08$) towards increase of total bacteria community size was observed for the replacement of 75% of concentrate with blocks in comparison to 0, 50 and 100% levels. No interaction ($P \geq 0.13$) block type \times level of concentrate replacement was observed for any of the analysed or calculated parameters.

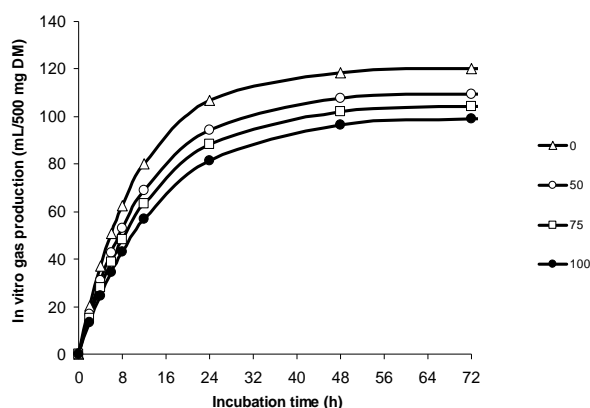


Figure 1 Gas production curve for control and diets including different levels of feed blocks incubated in batch cultures during 72 h. The gas production pattern was adjusted to the model: $y = A [1 - e^{-ct}]$ where y represents the cumulative gas production (mL); t , the incubation time (h); A , the asymptote (potential gas at the steady state; mL) and c , the gas production rate.

Discussion

Alternative nutrient resources are of interest to replace cereal-based concentrates in animal feeding. Our hypothesis is that partial replacement of cereal-based concentrates in ruminants diet with feed blocks including wastes from greenhouse horticulture could decrease feeding cost and environmental pollution without compromising ruminal fermentation. The inclusion of high-moisture by-products such as tomato and cucumber in ruminant diets is regarded as a challenging practice but feed blocks may allow their use in animal feeding (Ben Salem and Nefzaoui, 2003). Variability in chemical composition of wastes is very likely to exist due to regional, varietal and seasonal causes. However, tomato and cucumber fruit wastes from different seasons during the year used in our experiment showed a very stable chemical composition (data not shown). The presence of plant secondary compounds in the studied wastes could provide them with an added-value due to an antimethanogenic effect although their mechanisms of action are not yet completely understood (Patra and Saxena, 2010).

The type of feed block did not promote differences in pH, total gas and methane production, the rate of fermentation, VFA production and individual molar proportions and DM and NDF digestibility. Total bacteria and methanogens were not affected also by the type of block. Thus, inclusion of tomato, cucumber, a mixture of both or barley in feed blocks did not compromise ruminal fermentation and microbiota. These results are not in line with those reported by Johnson and Johnson, (1995) who stated that the type of carbohydrate influences pH and subsequently alter the microbiota present. Higher structural carbohydrates content in diets containing feed blocks may explain the higher acetate production and thus, increased acetate to propionate ratios promoted by these diets in comparison to the control one in agreement with observations made by Beever et al. (1989). Several authors have found low DM and NDF digestibility in lambs fed diets containing feed blocks (Ben Salem and Znaidi, 2008), and this is in agreement with the results found in our work. While Molina-Alcaide et al. (2009) found increased VFA concentration values in goats when concentrate was replaced with FB containing two-stage olive cake we observed decreasing values with FB. Additionally, concentrate replacement $\geq 75\%$ with feed blocks in diets decreased butyrate molar proportion, in agreement with Getachew et al. (2004), who observed a positive correlation between NSC level in diets and butyrate production. The increase in butyrate might only be due to an increase in the concentration and/or activity of butyrate-producing bacteria (Carro and Ranilla, 2003). Low protein availability and nutritive value of tomato was reported by Ventura et al. (2009) and Cone and van Gelder, (1999). Blaxter and Clapperton, (1965) reported that low gas production would indicate low degradability. However, the similar ruminal fermentation pattern found for diets including the different types of FB could suggest an improved digestion of either tomato or cucumber fruits when included in multinutrient FB.

There is no information concerning gas production from diets including tomato or cucumber fruits in the literature. The volume of gas produced after 24 h of incubation ranged from 163, for diets including 100% of feed block, to 214 ml/g DM, for diets without feed block, values which were similar to those found by Gierus et al. (2008) and Blümmel et al. (1999) after 24 h incubation for grass silage, oat-whole crop silage and maize stover leaves (200, 214 and 201 ml/g DM, respectively). However, values of gas production in diets containing FB were not in the line of those found for cereals or legumes. Carro and Ranilla (2003) reported values ranging between 366 and 384 ml gas / g incubated DM for wheat, barley, maize and shorgum

Capítulo 4

grains. Maheri-Sis et al. (2010) incubating 2 types of chickpeas found gas production values varying from 370 to 393 ml gas / g incubated DM. A higher content of NSC in these samples than in ours would be the reason of a bigger gas productions compared to our results (El-Adawy et al., 2002). The amount of gas produced by the fermentation of a diet is closely related to its digestibility and therefore to its energy value for ruminants (Menke et al., 1979). Therefore, as concentrate substitution level increased in our diets, lower gas production and slower fermentation rates were observed, resulting in a decreased DM and NDF digestibility of feed blocks-containing diets. The decrease of fermentation rate is more pronounced with materials containing cellulose and less pronounced with easily fermentable carbohydrates. In fact, in the present study, the rate of gas production was higher (from 0.071 to 0.092 ml/h) than values found for shrubs such as *Arbutus unedo* and *Quercus suber* (0.065 and 0.046 ml/h, respectively; Gasmiboubaker et al. 2006). Our results are also higher than those found for different oak species treated with PEG such *Q. persica*, *Q. infectoria* and *Q. libani* (0.054, 0.060 and 0.057 ml/h, respectively; Elahi and Rouzbehan, 2008).

The differences found when compared with previous works from other authors could be related to the amount and characteristics of substrate incubated as well as the animal species used as donors of ruminal liquor used as inoculum. Indeed differences in ruminal fermentation promoted by rumen liquor from goats and sheep have been reported (Molina-Alcaide et al., 1997).

To our knowledge, there is no information concerning methane emissions using agroindustrial by-products feed blocks in animal feeding. The increase in concentrate substitution level promoted a reduction in methane production values being within the physiological range found in the rumen by (Kumar et al. (2009). The lower DM digestibility and VFA production observed with increased concentrate

substitution level might be related to the antimethanogenic effect of FB (Benchaar et al., 2001). However, increased acetate molar proportion, reduced butyrate molar proportion and methane:total VFAs ratios found as well as the lack of effect on propionate molar proportion as results of feed blocks inclusion in the diet suggest that the mechanism of action of feed blocks supplementation is related to a direct inhibition of methanogenesis. A reduction in methane production per unit of synthesised VFA in the rumen without increased propionate molar proportion could be possible when other metabolic pathways, like homoacetogenesis, act as hydrogen sinks (Yu and Morrison, 2004). Plant defensive compounds commonly known as plant secondary compounds (PSC) include phenolics, saponins, alkaloids, non-protein amino acids, essential oils and glycosides. The presence of these PSC in FB could modify rumen fermentation, inhibiting enteric methanogenesis by mechanisms that still are not well understood (Newbold et al., 2004; Guo et al., 2008; Patra and Saxena, 2010). Increased presence of condensed tannins with increased level of feed blocks in the diet may have contributed to the methane reduction. Condensed tannins are thought to directly inhibit methanogens, as well as indirectly limit methanogenesis through a reduction in hydrogen availability (Grainger et al., 2010).

Despite the decreased gas production and methane concentration values when concentrate was substitute with feed blocks in our experiment, only a trend to higher total bacteria abundance with 75% of concentrate replacement was observed. Although no relationship between methanogens abundance and methanogenesis has been found (Firkins and Yu, 2006) it is unclear how methanogens diversity may determine the role of this microbial group in methanogenesis (Yu and Morrison, 2004).

Table 5 Absolute abundances of total bacteria and methanogens (log gene copies/g fresh matter).

	Block type*				Substitution level				SEM	P-value		
	T	C	TC	B	0	50	75	100		Block type (BT)	Substitution level (SL)	BT × SL
Total bacteria	9.56	9.50	9.58	9.67	9.45	9.56	9.65	9.51	0.027	0.43	0.08	0.13
Methanogenic archaea	8.81	8.74	8.51	8.53	8.94	9.00	8.60	8.35	0.13	0.89	0.27	0.99

*Feed blocks including tomato (T), cucumber (C), a mixture of tomato and cucumber (TC) and barley (B).

Conclusion

The replacement of concentrate with feed blocks modified ruminal fermentation, DM and NDF digestibility and had an antimethanogenic effect, being more pronounced with increasing levels of concentrate replacement with feed blocks. Further *in vivo* research should be done to study the effect of replacing 50% or 75% of concentrate with feed blocks on ruminal fermentation, nutrients utilization, products quality and methane production.

Acknowledgements

The authors wish to acknowledge the financial support from the Junta de Andalucía (Excellence Projects P05-AGR-0408 and P07-RNM-02746). Manuel Romero is grateful to the CSIC for JAE-CSIC grant. Thanks to J. Fernandez and T. Garcia for technical assistance. Thanks for the Plant of Wastes Treatment Factory in Motril (Granada, Spain) for providing us with tomato fruits wastes.

References

- AOAC., 2005: *Official Methods of Analysis*, 18th ed. AOAC International Gaithersburg, MD, USA.
- Aguilera, J.F.; Prieto, C.; and Fonollá, J., 1990: Protein and energy metabolism of lactating Granadina goats. *The British journal of nutrition* **63**, 165-175.
- Beever, D.; Cammell, S.; Sutton, J.; Spooner, M.; Haines, M.; and Harland, J., 1989: Effect of concentrate type on energy utilisation in lactating dairy cows. *Proceedings 11th Symposium on Energy Metabolism EAAP*, Publication No. **43**:33.
- Benchaar, C.; Pomar, C.; and Chiquette, J., 2001: Evaluation of dietary strategies to reduce methane production in ruminants: a modelling approach. *Canadian Journal of Animal Science* **81**, 563-574.
- Ben Salem, H.; and Nefzaoui, A., 2003: Feed blocks as alternative supplements for sheep and goats. *Small Ruminant Research* **49**, 275-288.
- Ben Salem, H.; and Smith, T., 2008: Feeding strategies to increase small ruminant production in dry environments. *Small Ruminant Research* **77**, 174-194.
- Ben Salem, H.; and Znaidi, I.A., 2008: Partial replacement of concentrate with tomato pulp and olive cake-based feed blocks as supplements for lambs fed wheat straw. *Animal Feed Science and Technology* **147**, 206-222.
- Blaxter, K.L.; and Clapperton, J.L., 1965: Prediction of the amount of methane produced by ruminants. *The British journal of nutrition* **19**, 511-22.
- Blümmel, M.; M Gomezulu, R.; Chen, X.B.; Makkar, H.P.S.; Becker, K.; and Ørskov, E.R., 1999: The modification of an *in vitro* gas production test to detect roughage related differences in *in vivo* microbial protein synthesis as estimated by the excretion of purine derivatives. *The Journal of Agricultural Science* **133**, 335-340.
- Carro, M.D.; and Ranilla, M.J., 2003: Effect of the addition of malate on *in vitro* rumen fermentation of cereal grains. *The British journal of nutrition* **89**, 181-188.
- Cone, J.; and van Gelder, A., 1999: Influence of protein fermentation on gas production profiles. *Animal Feed Science and Technology* **76**, 251-264.
- Denek, N.; and Can, A., 2006: Feeding value of wet tomato pomace ensiled with wheat straw and wheat grain for Awassi sheep. *Small Ruminant Research* **65**, 260-265.
- Denman, S.E.; Tomkins, N.W.; and McSweeney, C.S., 2007: Quantitation and diversity analysis of ruminal methanogenic populations in response to the antimethanogenic compound bromochloromethane. *FEMS Microbiol Ecol* **62**, 313-322.
- El-Adawy, T.A., 2002: Nutritional composition and antinutritional factors of chickpeas (*Cicer arietinum L.*) undergoing different cooking methods and germination. *Plant foods for human nutrition (Dordrecht, Netherlands)* **57**, 83-97.
- Elahi, M.Y.; and Rouzbehan, Y., 2008: Characterization of *Quercus persica*, *Quercus infectoria* and *Quercus libani* as ruminant feeds. *Animal Feed Science and Technology* **140**, 78-89.
- FAO., 2010: World Food Situation. Food price indexes data., <http://www.fao.org/worldfoodsituation/FoodPriceIndex/en/>.
- Firkins, J.L.; and Yu, Z., 2006: Characterisation and quantification of the microbial populations of the rumen. In: *Ruminant Physiology, Digestion, Metabolism and Impact of Nutrition on Gene Expression, Immunology and Stress* (eds K. Sejrsen, T. Hvelplund and M. O. Nielsen). Wageningen, Netherlands: Wageningen Academic Publishers., 19-54.

Capítulo 4

- Fondevila, M.; Guada, J.A.; Gasa, J.; Castrillo, C., 1994: Tomato pomace as a protein supplement for growing lambs. *Small Ruminant Research* **13**, 117-126.
- Gasmiboubaker, A.; Kayouli, C.; Buldgen, A.; Boukary, A.; Ammar, H.; and Lopez, S., 2006: Effect of feed block supply on the ruminal ecosystem of goats grazing shrub land in Tunisia. *Animal Feed Science and Technology* **127**, 1-12.
- Getachew, G.; Robinson, P.H.; DePeters, E.J.; Taylor, S.J., 2004: Relationships between chemical composition, dry matter degradation and in vitro gas production of several ruminant feeds. *Animal Feed Science and Technology* **111**, 57-71.
- Gierus, M.; Schiborra, A.; Sudekum, K.; Rave, G.; and Taube, F., 2008: Comparison of gas accumulation profiles of several feeds using manual or automated gas production methods. *Animal Feed Science and Technology* **147**, 310-325.
- Goering, H.K.; and Van Soest, P.J., 1970: Forage fiber analyses. *USDA-ARS Agriculture Handbook*, No. 379, Washington, DC, USA.
- Grainger, C.; Williams, R.; Clarke, T.; Wright, A-D.G.; and Eckard, R.J., 2010: Supplementation with whole cottonseed causes long-term reduction of methane emissions from lactating dairy cows offered a forage and cereal grain diet. *Journal of dairy science* **93**, 2612-2619.
- Guo, Y.Q.; Liu, J.-X.; Lu, Y.; Zhu, W.Y.; Denman, S.E.; and McSweeney, C.S., 2008: Effect of tea saponin on methanogenesis, microbial community structure and expression of mcrA gene, in cultures of rumen microorganisms. *Letters in applied microbiology* **47**, 421-426.
- Hook, S.E.; Wright, A-D.G.; and McBride, B.W., 2010: Methanogens: Methane Producers of the Rumen and Mitigation Strategies. *Archaea* **2010**, 1-11.
- Isac, M.D.; García, M.A.; Aguilera, J.F.; and Molina-Alcaide, E., 1994: A comparative study of nutrient digestibility, kinetics of digestion and passage and rumen fermentation pattern in goats and sheep offered medium quality forages at the maintenance level of feeding. *Arch. Tierernähr* **46**, 37-50.
- Johnson, K.A.; and Johnson, D.E., 1995: Methane emissions from cattle. *Journal of Animal Science* **2483-2492**.
- Kumar, S.; Puniya, A.K.; Puniya, M.; Dagar, S.S.; Sirohi, S.K.; Singh, K.; and Griffith, G.W., 2009: Factors affecting rumen methanogens and methane mitigation strategies. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **25**, 1557-1566.
- Maeda, H.; Fujimoto, C.; Haruki, Y.; Maeda, T.; Kokeyuchi, S.; Petelin, M.; Arai, H.; Tanimoto, I.; Nishimura, F.; and Takashiba, S., 2003: Quantitative real-time PCR using TaqMan and SYBR Green for *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, tetQ gene and total bacteria. *FEMS Immuno. Med Microbiol* **39**, 81-86.
- Maheri-Sis, N.; Chamani, M.; Ali-Asghar, S.; Mirza-Aghazadeh, A.; and Aghajanzadeh-Golshani, A., 2010: Nutritional evaluation of kabuli and desi type chickpeas (*Cicer arietinum L.*) for ruminants using in vitro gas production technique. *African Journal of Biotechnology* **7**, 2946-2951.
- MARM., 2009: Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino. *Anuario de Estadística*. http://www.mapa.es/estadistica/pags/anuario/2009/Anuario_2009.pdf
- Menke, K.H.; Raab, L.; Salewski, A.; Steingass, H.; Fritz, D.; and Schneider, W., 1979: The estimation of the digestibility and metabolizable energy content of ruminant feedingstuffs from the gas production when they are incubated with rumen liquor in vitro. *Journal of Agricultural Science* **93**, 217-222.
- Molina-Alcaide, E.; García, M.A.; and Aguilera, J.F., 1997: The voluntary intake and rumen digestion by grazing goats and sheep of a low-quality pasture from a semi-arid land. *Livestock Production Science* **52**, 39-47.
- Molina-Alcaide, E.; Pascual, M.R.; Cantalapiedra-Hijar, G.; Morales-García, E.Y.; and Martín-García, A.I., 2009: Effects of concentrate replacement by feed blocks on ruminal fermentation and microbial growth in goats and single-flow continuous-culture fermenters. *Journal of animal science* **87**, 1321-1333.
- Molina-Alcaide, E.; Morales-García, E.Y.; Martín-García, A.I.; Ben Salem, H.; Nefzaoui, A.; and Sanz-Sampelayo, M.R., 2010: Effects of partial replacement of concentrate with feed blocks on nutrient utilization, microbial N flow, and milk yield and composition in goats. *Journal of dairy science* **93**, 2076-2087.
- Morales, A.R.; Galina, M.A.; Jimenez, S.; Haenlein, G.F.W., 2000: Improvement of biosustainability of a goat feeding system with key supplementation. *Small Ruminant Research* **35**, 97-105.
- Newbold, C.J.; McIntosh, F.M.; Williams, P.; Riccardo Losac, and Wallace R.J., 2004: Effects of a specific blend of essential oil compounds on

- rumen fermentation. *Animal feed science and technology* **114**, 105-112.
- Patra, A.K.; and Saxena, J., 2010: A new perspective on the use of plant secondary metabolites to inhibit methanogenesis in the rumen. *Phytochemistry* **71**, 1198-1222.
- Perez-Maldonado, R.A.; and Norton, B.W., 1996: Digestion of ¹⁴C-labelled condensed tannins from *Desmodium intortum* in sheep and goats. *The British journal of nutrition* **76**, 501-513.
- Van Soest, P.; Wine, R.; and Moore, L., 1966: Estimation of the true digestibility of forages by the in vitro digestion of cell walls. *Proceedings of the 10th international grassland Congress., Helsinki, Finland* **10**, 438-441.
- 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.
- Theodorou, M.K.; Williams, B.A.; Dhanoa, M.S.; McAllan, A.B.; and France, J., 1994: A simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feeds. *Animal Feed Science and Technology* **48**, 185-197.
- Vasta, V.; Makkar, H.P.S.; Mele, M.; and Priolo, A., 2009: Ruminant biohydrogenation as affected by tannins in vitro. *The British journal of nutrition* **102**, 82-92.
- Ventura, M.R.; Pieltain, M.C.; and Castanon, J.I.R., 2009: Evaluation of tomato crop by-products as feed for goats. *Animal Feed Science and Technology* **154**, 271-275.
- Yu, Z.; and Morrison, M., 2004: Comparisons of different hypervariable regions of rrs genes for use in fingerprinting of microbial communities by PCR-denaturing gradient gel electrophoresis. *Applied and environmental microbiology* **70**, 4800-4806.

Publicación 2

Effect of the partial replacement of concentrate with feed blocks including greenhouse wastes on nutrient utilization, ruminal fermentation, microbial N flow, bacterial and methanogens abundances and methane emissions in goats

M. Romero-Huelva and E. Molina-Alcaide

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

(En revisión en Journal of Animal Science)

ABSTRACT. The effects of replacing, in goats diet, 50% of cereals-based concentrate with feed blocks (FB) including waste fruits of tomato, cucumber or barley grain, on nutrient utilization, ruminal fermentation, microbial N flow to the duodenum, methane emissions and abundances of total bacteria and methanogen were studied. Four adult, dry, non pregnant, rumen-fistulated Granadina goats (32.1 ± 5.52 kg BW) were used and 4 diets were studied in 4 trials by following a 4 x 4 Latin square experimental design. Diets consisted of alfalfa hay (A) plus concentrate (C) in a 1:1 ratio (diet AC) or 1:0.5 plus feed blocks (FB) including wastes of tomato fruit (diet ACT), cucumber (diet ACC) or barley (diet ACB). In each trial, each goat was randomly assigned to one of the diets. The intakes of FB were 203 ± 72.9 , 179 ± 39.7 and 144 ± 68.1 g per animal and day, respectively. A reduction in feeding cost by 32% may be achieved with feed blocks containing diets. The replacement of 50% of concentrate with feed blocks including wastes of tomato or cucumber fruits did not ($P > 0.05$) compromise N and energy digestive and metabolic utilization. Cucumber-based feed blocks decreased the purine bases (PB):N ratio ($P = 0.019$) in total bacterial pellets isolated from the rumen content. Tomato-based feed blocks decreased purine derivatives urinary excretion ($P = 0.042$) and microbial N flow ($P = 0.030$) without affecting the efficiency of synthesis but a decreased methane emission by 33% ($P < 0.001$) compared to the other studied diets was observed with this type of FB. Tomato and cucumber-based FB lead to higher ($P < 0.001$) rumen VFA concentration and molar proportions of propionate and butyrate ($P \leq 0.018$) than AC and ACB diets. No effect ($P = 0.072$) of diet on total bacteria abundance was observed while the abundance of methanogens increased ($P = 0.015$) with wastes-based feed blocks. Feed blocks including barley compromised nutrient and energy utilization ($P \leq 0.049$) and promoted worse fermentation pattern than feed blocks including waste fruits. Our study suggests that cucumber FB could replace half of the amount of concentrate in goat diet without compromising rumen fermentation, nutrient and energy utilization and without increasing in methane emissions. Blocks including tomato waste fruits showed antimethanogenic effect but reduced microbial N flow to the duodenum. Further research is needed to both improve ruminal protein yield and energy utilization promoted by diets including tomato-based FB, which may limit their use in non-productive ruminants practical feeding, and state the effect of including tomato and cucumber-based FB in productive ruminant diet on products quality.

Key words: concentrate, feed blocks, greenhouse wastes, methane emissions, nutrients utilization, ruminal fermentation and microbiota.

INTRODUCTION

In Mediterranean countries ruminant production is limited by poor quality and scarcity of pastures. As a consequence a high dependence of concentrates based on cereals exists. Increased cereal prices (FAO, 2010) has driven the attention of ruminant nutritionists toward local resources (Ben Salem and Znaidi, 2008; Molina-Alcaide et al., 2009, 2010a). The use of wastes in ruminant feeding may reduce costs and environmental problems associated with wastes accumulation (Morales et al., 2000; Vasta et al., 2009) and animal production impact (Scollan et al., 2011). Methane emission from the enteric fermentation is of concern worldwide due to its potential as greenhouse gas (Wright and Klieve, 2011). Additionally methane represents an energy loss arising from 2 to 12% of the gross energy supply for the animal (Johnson and Johnson, 1995; Hook et al., 2010). In the Mediterranean area, greenhouse culture accounts for 15% of world horticulture

production Spain being the main producer (MARM, 2009) generating large amounts of fruit wastes, mainly tomato and cucumber, which have to be stored with economic and environmental troubles. Tomato pulp and pomace, by-products from tomato processing industry, have been studied in ruminant feeding (Fondevila et al., 1994; Denek and Can, 2006; Ben Salem and Znaidi, 2008) but little information exists on tomato fruits (Ventura et al., 2009) and data on the use of cucumber fruits in ruminant feeding are scanty.

The high water content in tomato and cucumber fruits made feed blocks (Ben Salem and Nefzaoui, 2003; Molina-Alcaide et al., 2009, 2010a) an adequate technology to allow the inclusion of those wastes in goats diet. Secondary compounds in those wastes may add a value by decreasing methanogenesis (Patra and Saxena, 2010).

Capítulo 4

Our hypothesis is that tomato and cucumber waste fruits could partially replace cereal-based concentrates in goat diet without compromising ruminal fermentation and microbiota and reducing methane emissions. Thus the aim of the present experiment was to study, in non-productive goats, the effect of replacing 50% of cereal-based concentrates in the diet with feed blocks including wastes of tomato or cucumber fruits on nutrients and energy utilization, ruminal fermentation and methane emissions and abundances of total bacteria and methanogens.

MATERIALS AND METHODS

Animals, Wastes and Diets

Four adult dry non pregnant rumen-fistulated Granadina goats (32.1 ± 5.52 kg BW) were used. The animals were placed in individual boxes and had free access to water. Animals' management and rumen content sampling were carried out by trained personnel. Animals were cared and handled in accordance with the Spanish guidelines for experimental animal protection (Royal Decree 1201/2005 of October 10 on the protection of animals used for experimentation or other scientific purposes) in line with the European Convention for the Protection of Vertebrates used for Experimental and other Scientific Purposes (European Directive 86/609).

Tomato and cucumber waste fruits were collected at the Plant of Wastes Treatment in Motril (Granada, Spain) which collect all the waste from greenhouse horticulture in Granada coast. Fruits were cut and kept at -20°C before used for feed blocks preparation. For feed blocks manufacturing solid ingredients were ground (4 mm) and mixed in a horizontal mixer (P. Prat model C, Sabadell, Spain). Block manufacturing followed the protocol described by Molina-Alcaide et al. (2009, 2010a) with some modifications. Solid ingredients were mixed with a mixture composed of quicklime solution, salt, beet molasses, urea, and greenhouse fruits wastes and then heavily packed in aluminium molds. Compacted blocks were removed from the molds, air-dried at room temperature, and stored until distribution to the animals.

Four experimental diets were formulated with alfalfa hay (A) plus concentrate (C) in a 1:1 ratio (diet AC), which represent the one used in practical conditions for goats feeding in the area. In the experimental diets 50% of the concentrate was replaced with feed blocks (FB) (Table 1) including wastes of tomato (diet ACT), cucumber (diet ACC) or barley (diet ACB).

Experimental procedure

Four 39-d trials were carried out by following a 4 x 4 Latin square design. Experimental treatments were

assigned randomly within each trial, with 4 replications for each diet at the end of the experiment. After 25 d of adaptation to the corresponding experimental diet animals were moved to individual metabolism crates.

Table 1. Ingredients composition of feed blocks (g / kg dry matter).

Ingredient	Feed block Tomato	Feed block Cucumber	Feed block Barley
Tomato	125	0	0
Cucumber	0	67	0
Barley	0	0	81
Sunflower meal	94	101	99
Wheat straw	581	620	609
Beet molasses	29	31	31
Quicklime	79	85	83
NaCl	47	50	50
Urea	34	35	36
Vitamin-mineral mixture ¹	11	11	11

¹Formulated (per kilogram) with NaCl, 277 g; ashes from the two-stage dried olive cake, 270 g; $(\text{PO}_4)_2\text{H}_4\text{Ca}$, 250 g; MgSO_4 , 200 g; CuO, 184 mg; I, 25 mg; CoO, 8.5 mg; Se, 4 mg; ZnO, 2.28 mg; and 83,500 and 16,700 IU of vitamins A and D, respectively.

After 3 d of adaptation to metabolism crates total faeces and urine productions were collected for 5 d. Control diet was supplied to meet the energy requirements for this species and breed (Prieto et al., 1990). No refusals for alfalfa hay and concentrate were observed for any of the dietary treatments. Feed blocks were supplied ad libitum, resulting in average intakes of 203 ± 72.9 , 179 ± 39.7 and 144 ± 68.1 g of fresh matter / animal / d, respectively, for feed blocks based on tomato, cucumber and barley. During the sampling period aliquots of hay and concentrate supplied to the animals were collected and stored at -20°C for chemical analyses. Blocks refusals from each animal were collected daily in the morning and weighed aliquots of blocks refusals were also stored at -20°C for chemical analyses. Urine was collected in buckets with 10% HCl (vol/vol) to maintain pH below 3 and avoid any N loss. Aliquots (100-mL) of urine were daily taken for density measurement and analysis of purine derivative (PD) and creatinine concentrations. Aliquots representing 10 and 20% of daily faeces and urine production, respectively, were stored at -20°C for chemical analyses. On d 35, rumen content samples (100 mL) were obtained from each animal before feeding and strained through 2 layers of cheesecloth for pH measurement, and aliquots were taken for $\text{NH}_3\text{-N}$, VFA analysis and quantification of bacterial and archaeal abundances by real-time PCR. On day 36, samples (500-mL) of rumen contents were also obtained from each animal before feeding for isolation of total

bacterial pellets (TB). For TB isolation, rumen contents were strained through 4 layers of gauze. The liquid fraction was kept at 4°C and the solid fraction was resuspended in cold (4°C) NaCl (9 g / L of solid) plus methylcellulose 0.1% solution (3 mL / g of solid), and incubated at 38°C for 15 min constantly shaking. Then the solution was subjected to vigorous mechanical pummeling between 2 metal plates (Masticator, IUL Instruments GmbH, Königswinter, Germany) for 5 min to detach bacteria from the feed particles (Michalet-Doreau and Ould-Bah, 1992) and kept at 4°C for 24 h. The solution was strained through 4 layers of cheesecloth and pool with the liquid fraction. The pool solution was centrifuged (500 × g for 10 min at 4°C, and supernatant fraction at 20,000 × g for 30 min at 4°C). The pellet was resuspended with cold (4°C) NaCl solution (9 g / L) and centrifuged again (20,000 × g for 30 min at 4°C). All bacterial pellets were lyophilized and ground to a fine powder with a mortar and pestle before analyzed for DM, N, and purine bases (PB). On day 36 animals were moved to a set of four open circuit respiration chambers for methane emissions measurement and kept until day 39 of each trial. Each chamber measured 1.8 m wide × 1.8 m deep × 1.5 m tall and was constructed of metal frame and polycarbonate. The air temperature in the chamber was maintained between 10 and 20 °C. Measurement interruptions occurred daily at 0900 h, when the chamber floor was cleaned and the goats received the morning feed. These interruptions had little impact on the daily emissions as they lasted for around 10 min for each chamber and occurred when the corresponding exhaust duct was not being sampled. Fluxes were calculated twice a day and then averaged to derive the 24-h emission value.

Real-time PCR analysis

The abundances of total bacteria and methanogens in the rumen of goats were quantified by quantitative real time PCR (qPCR). The DNA extraction and purification were performed from approximately 50 mg freeze-dried samples of rumen contents, using the repeated bead beating (Mini-bead Beater; BioSpec Products, Bartlesville, OK) plus column procedure of Yu and Morrison (2004a). Yield and purity of the extracted DNA were assessed using NanoDrop

ND-1000 Spectrophotometer (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE). The DNA was used as templates to quantify the copy numbers of 16S rRNA (for bacteria) and methyl coenzyme M reductase A (*mcrA*) gene (for methanogenic archaea) by real-time PCR (qPCR). The 16S rRNA and *mcrA* gene-targeted primer sets used in this study are showed in Table 2. The absolute amount for each microbial group, expressed as the number of DNA copies / g of fresh matter, was determined using standards. The external standards for bacteria were described by Denman and McSweeney (2006) and a six log dilution series was used. External standards for methanogens were prepared using a mixture of pure cultures of *Methanobrevibacter ruminantium* M1^T and *Methanobrevibacter smithii* PS^T as described by Christophersen et al. (2007) and ranged from 1.0×10³ to 1.0×10⁸ cells.

Three replicates of each DNA extract were used and a negative control (sterile distilled water) was loaded on each plate run to screen for possible contamination and dimers formation and to set the background fluorescence for plate normalization. Quantitative real-time PCR was performed using a CFX96™ Real-Time PCR Detection System (BioRad, Laboratories Inc., Hercules, CA, USA) in a 25 µl volume containing the following reagents: 12.5 µl SYBR® Green supermix (Quanti-Tect™ SYBR® Green PCR, Qiagen), 400nM (final concentration) of each primer, 6.5 µl ddH₂O and 1.0 µl template DNA (10 ng). Real-time PCR amplification was initiated by a hot start at 95°C for 15 min, followed by 40 cycles at 95°C for 30 s, 60°C for 30 s and 72°C for 60 s (for bacteria) and 30 s (for methanogens). Fluorescence was acquired during extension using an excitation wavelength of 470 nm and emission detection at 530 nm. A final melting curve analysis was carried out by continuously monitoring fluorescence between 60°C and 95°C with 0.5°C increments every 10 s. Three dilutions of DNA were amplified and the C_t of the most efficient PCR was recorded. Threshold cycles (C_t) and all post run data analyses were performed automatically by using Bio Rad CFX Manager Software (version 1.6.541.1028).

Table 2. PCR primers used for real-time PCR analysis.

Target group	Name	Sequence (given in 5' to 3' direction)	Ref.
Bacteria	1114F	CGG CAA CGA GCG CAA CCC	Denman and McSweeney, (2006)
	1275R	CCA TTG TAG CAC GTG TGT AGC C	
Archaea	Met630F	GGA TTA GAT ACC CSG GTA GT	Christophersen et al. (2008)
	Met803R	GTT GAR TCC AAT TAA ACC GCA	

^aS = G or C, R = A or G.

Capítulo 4

Chemical Analyses

Dry matter (AOAC, 2005; method 934.01), ash (AOAC, 2005; method 942.05), ether extract (AOAC, 2005; method 920.39), and N (AOAC, 2005; method 984.13) in samples of supplied and refused diets, feces, and urine were determined according to the AOAC (2005) methods. The N values of feeds, refusals, feces, and urine, analyzed by the Kjeldahl procedure, were converted to CP by multiplying by a factor of 6.25. The NDF and ADF contents were analyzed according to Van Soest et al. (1991) using an Ankom220 Fiber Analyzer unit (Ankom Technology Corp., Macedon, NY) with α -amylase for NDF analysis in concentrate samples and both NDF and ADF were expressed exclusive of residual ash. Lignin was determined by solubilization of cellulose with 72% sulfuric acid. Free, protein-bound, and fiber-bound condensed tannins were sequentially extracted following the procedure described by Pérez-Maldonado and Norton (1996). Condensed tannins from quebracho powder (Roy Wilson Dickson Ltd., Mold, UK) were used as a standard. The fat content in feedstuffs and feces was measured by extraction with petroleum ether (boiling point, 40 to 60°C). The energy content of the samples was determined by using an adiabatic calorimeter (model 1356, Parr Instruments Co., Moline, IL). Rumen content samples were also analyzed for total and individual VFA by gas chromatography following the method described by Isac et al. (1994). The $\text{NH}_3\text{-N}$ concentration in rumen samples was determined by a colorimetric method (Weatherburn, 1967).

For methane measurements air stream in each duct of chambers was subsampled, and methane concentration was measured continuously using a Gas analyser ADC MGA3000 (Spurling Works, Herts, UK).

The purine bases (PB) concentration in feeds and TB pellets isolated from the rumen and creatinine and PD in urine were determined according to Balcells et al. (1992) using HPLC, which consisted of a multisolvent delivery system (model 510; Waters, Milford, MA), an injector (WatersTM 717 plus Autosampler, Waters), a multiwavelength detector (model 481; Lambda-Max, LC Spectrophotometer, Waters, set to 205 nm), and a double 4.0 mm \times 250 mm C18 ODS-2 analytical

column (Waters Spherisorb). The PB and PD were quantified by peak integration using the Waters HPLC systems software Millennium32.

Calculations and Statistical Analyses

The apparent nutrients digestibility was calculated from nutrient intakes and losses in faeces. The N and energy balances were obtained taking into account the urinary and fecal N and energy losses and the energy in methane produced (0.890 MJ/mol of methane; Newbold et al., 2007). The PB daily flow was calculated as daily PD urine excretion / PB recovery rate estimated as 0.76 by Belenguer et al. (2002). The microbial N flow (MNF) was estimated from PB daily flow and PB:N ratios in the TB pellet for each dietary treatment. The efficiency of microbial N synthesis was expressed per kilogram of OM apparently fermented in the rumen, calculated as 0.65 of digestible OM intake (ARC, 1984). The flux of methane for each chamber was calculated for the last 2-d of measurement period from the fresh-air intake and chamber exhaust concentrations and mean air flow (L/min).

The SPSS for Windows, version 19.0 (2010; SPSS Inc., Chicago, IL) was used for data entry and statistical analysis. Data were analyzed by GLM using the repeated measures ANOVA by following a 4 \times 4 Latin square design. Diet was considered as fixed effect, and period and animal were considered as random effects. When a significant effect of diet was found, post hoc comparison of means was made using the DMS test. Differences were considered significant at $P < 0.05$.

RESULTS

Compared with concentrate, feed blocks were lower in OM, CP, gross energy and ether extract, but higher in NDF, ADF and acid detergent lignin (Table 3). Crude protein and energy contents were similar for all feed blocks. Feed blocks were rich in fibre-bound, protein-bound and total condensed tannins compared to the concentrate. However, free condensed tannins concentration in wastes-based blocks and concentrate were similar.

Table 3. Chemical composition of diet ingredients (g / kg dry matter)

Item	Alfalfa hay	Concentrate	Feed block Tomato	Feed block Cucumber	Feed block Barley
Dry matter, g / kg fresh matter	918	925	906	908	898
OM	896	908	800	791	810
CP	155	183	149	149	143
NDF	570	381	480	459	481
ADF	394	148	285	275	287
Acid detergent lignin	91.2	25.6	49.6	49.9	50.3
Ether extract	9.0	27.1	5.06	3.84	3.70
Gross energy, MJ/kg DM	17.3	18.5	15.5	14.9	15.3
Purine bases, $\mu\text{mol/g DM}$					
Adenine	5.44	3.75	1.81	1.57	1.03
Guanine	6.43	4.55	3.69	1.87	2.85
Total	11.9	8.30	5.49	3.44	3.89
Condensed tannins					
Free	0.84	0.59	0.61	0.68	0.94
Fibre-bound	9.31	5.26	17.9	16.2	14.6
Protein-bound	0.93	1.01	1.31	1.35	1.23
Total ¹	11.1	6.87	19.9	18.2	16.7

¹ Calculated as free + fibre-bound + protein-bound tannins

The concentrate DM intake decreased ($P < 0.001$) with the inclusion of feed blocks in diet (Table 4). Fat intake was higher ($P = 0.001$) for diet AC in comparison to diets ACT, ACC and ACB. Total and alfalfa hay DM intakes were not affected ($P \leq 0.841$) by the inclusion of FB in the diet which did not affect total intakes of OM ($P = 0.498$), CP ($P = 0.065$), NDF ($P = 0.677$) and ADF ($P = 0.678$). Apparent digestibility of DM ($P = 0.022$) and OM ($P = 0.021$) decreased for

diets including tomato and cucumber-based FB but not for diet including barley-based FB compared to diet AC. The apparent digestibility of fat decreased ($P = 0.049$) in animals fed diets including tomato and barley-based FB but not for diet including cucumber-based FB compared with the control diet. The apparent digestibility of CP ($P = 0.802$), NDF ($P = 0.939$) and ADF ($P = 0.923$) was similar for all the studied diets.

Table 4. Average (n = 4) values for intake and apparent digestibility of nutrients in goats fed the experimental diets¹.

Item	Diet				SEM ²	P-value
	AC	ACT	ACC	ACB		
Intake, g / d						
Total dry matter	639	651	639	586	31.2	0.605
Alfalfa hay	316	309	313	302	21.6	0.841
Concentrate	323 ^b	156 ^a	162 ^a	156 ^a	11.7	< 0.001
Blocks	0 ^a	185 ^d	164 ^c	128 ^b	5.81	< 0.001
OM	578	570	558	517	27.8	0.498
Fat	11.6 ^b	7.97 ^a	7.80 ^a	7.31 ^a	0.52	0.001
CP	106	103	109	92.9	5.44	0.065
NDF	305	328	314	287	15.9	0.677
ADF	174	197	191	175	9.10	0.678
Apparent digestibility, g / g						
Dry matter	0.68 ^b	0.62 ^a	0.64 ^a	0.67 ^{ab}	0.003	0.022
Organic matter	0.71 ^b	0.66 ^a	0.67 ^a	0.70 ^{ab}	0.003	0.021
Fat	0.68 ^b	0.58 ^a	0.63 ^{ab}	0.55 ^a	0.014	0.049
CP	0.72	0.70	0.72	0.73	0.005	0.802
NDF	0.59	0.60	0.57	0.59	0.006	0.939
ADF	0.56	0.55	0.57	0.58	0.007	0.923

^{a,b} Within a row means not bearing a common superscript letter differ ($P < 0.05$). ¹ AC = Alfalfa hay (25.6 g / kg BW^{0.75} / d) and concentrate (25.6 g / kg BW^{0.75} / d); ACT = Alfalfa hay (25.6 g / kg BW^{0.75} / d), concentrate (12.8 g / kg BW^{0.75} / d) and feed blocks including tomato wastes (15.5 g / kg BW^{0.75} / d); ACC = Alfalfa hay (25.6 g / kg BW^{0.75} / d), concentrate (12.8 g / kg BW^{0.75} / d) and feed blocks including cucumber wastes (13.7 g / kg BW^{0.75} / d); ACB = Alfalfa hay (25.6 g / kg BW^{0.75} / d), concentrate (12.8 g / kg BW^{0.75} / d) and feed blocks including barley (10.6 g / kg BW^{0.75} / d). ² SEM = Standard Error of the Mean.

Capítulo 4

The animals body ($P = 0.310$) and metabolic weight ($P = 0.270$) did not change with the dietary treatment (Table 5). Compared to diet AC the N intake ($P = 0.042$), digestible ($P = 0.046$) and balance ($P = 0.035$) N, per $\text{kg}^{0.75}$ was lower with diet including barley-based FB but N in faeces and urine did not change ($P = 0.074$

and 0.080 , respectively) with dietary treatment. The percentage of digestible N in intake N was not affected ($P = 0.801$) by diet but the percentage of N balance in digestible N was lower ($P = 0.04$) for diet including barley-based FB in comparison to diet AC.

Table 5. Average ($n = 4$) values for body and metabolic weight and N and energy utilization in goats fed the experimental diets¹

Item	Diet				SEM ²	P-value
	AC	ACT	ACC	ACB		
Body weight (BW), kg	31.8	32.7	31.6	32.4	3.05	0.310
BW ^{0.75}	13.3	13.6	13.3	13.5	0.951	0.270
g / kg BW ^{0.75}						
N intake	1.28 ^b	1.23 ^{ab}	1.31 ^b	1.10 ^a	0.054	0.042
Fecal N	0.354	0.359	0.360	0.286	0.012	0.074
Urine N	0.592	0.632	0.704	0.630	0.028	0.080
Digestible N ³	0.930 ^b	0.869 ^{ab}	0.949 ^b	0.814 ^a	0.041	0.046
N balance ⁴	0.339 ^b	0.237 ^{ab}	0.245 ^{ab}	0.184 ^a	0.015	0.035
N utilization, %						
Digestible N / intake N	72.4	70.3	72.0	73.4	0.495	0.801
N balance / digestible N	35.2 ^b	28.0 ^{ab}	25.4 ^{ab}	20.5 ^a	0.215	0.049
MJ / kg of BW ^{0.75}						
Energy intake	0.860	0.820	0.828	0.740	0.025	0.419
Fecal energy	0.254 ^b	0.281 ^b	0.283 ^b	0.235 ^a	0.008	0.038
Urine energy	0.040	0.037	0.039	0.034	0.003	0.924
Digestible energy ⁵	0.606 ^b	0.539 ^{ab}	0.546 ^{ab}	0.505 ^a	0.018	0.024
Methane energy ⁶	0.055 ^b	0.039 ^a	0.049 ^b	0.047 ^b	0.002	0.033
Metabolizable energy ⁷	0.512	0.462	0.458	0.424	0.015	0.082
Energy utilization, %						
Digestible energy / energy intake	70.5	65.8	65.8	68.1	0.380	0.078
Metabolizable energy / energy intake	59.6	56.4	55.2	57.2	0.558	0.054
Metabolizable energy / digestible energy	84.4 ^{ab}	85.5 ^b	83.8 ^a	84.0 ^{ab}	0.475	0.040

^{a,b} Within a row means not bearing a common superscript letter differ ($P < 0.05$). ¹ AC = Alfalfa hay (25.6 g / kg BW^{0.75} / d) and concentrate (25.6 g / kg BW^{0.75} / d); ACT = Alfalfa hay (25.6 g / kg BW^{0.75} / d), concentrate (12.8 g / kg BW^{0.75} / d) and feed blocks including tomato wastes (15.5 g / kg BW^{0.75} / d); ACC = Alfalfa hay (25.6 g / kg BW^{0.75} / d), concentrate (12.8 g / kg BW^{0.75} / d) and feed blocks including cucumber wastes (13.7 g / kg BW^{0.75} / d); ACB = Alfalfa hay (25.6 g / kg BW^{0.75} / d), concentrate (12.8 g / kg BW^{0.75} / d) and feed blocks including barley (10.6 g / kg BW^{0.75} / d). ² SEM = Standard Error of the Mean. ³ Digestible N = intake N – fecal N. ⁴ N balance = digestible N – urine N. ⁵ Digestible energy = energy intake – fecal energy. ⁶ Methane energy = 0.890 MJ/mol of CH₄ (Newbold et al., 2007). ⁷ Metabolizable energy = digestible energy – urine energy – methane energy.

The intake of energy was not different ($P = 0.419$) depending on diet as it occurs for energy in urine ($P = 0.924$) and metabolizable energy ($P = 0.082$). However, fecal ($P = 0.038$) and digestible ($P = 0.024$) energy content were lower for diet including barley-based FB in comparison to diet AC. Energy in methane decreased ($P = 0.033$) with diet including tomato-based FB compared to diets AC, ACC and ACB. The percentage of DE ($P = 0.078$) and ME ($P = 0.054$) in energy intake was similar for the animals fed all the diets although the percentage of ME in DE was lower ($P = 0.040$) for diet ACC compared to diet ACT.

Bacterial pellets showed similar DM ($P = 0.864$) and N ($P = 0.766$) contents with the different diets (Table 6). The average values of adenine in pellets were higher ($P < 0.001$) with diet ACT in comparison with AC, ACC and ACB. On the contrary guanine content showed lower ($P = 0.022$) values for diet ACC in comparison to the other diets. Total PB values were lower for diet ACC and higher with ACT diet in comparison to the other diets ($P = 0.034$) and the PB:N ratios were lower ($P = 0.019$) for diet ACC in comparison to the other studied diets. The urinary excretion of creatinine were similar ($P = 0.093$) for animals fed the different diets. Allantoin ($P = 0.046$),

total PD ($P = 0.042$) and MNF ($P = 0.030$) were lower for animals fed diet ACT in comparison to AC, ACC and ACB. Hypoxanthine ($P = 0.027$) and uric acid ($P = 0.033$) showed lower values for diets ACT and ACC than diets AC and ACB. On the contrary xanthine ($P = 0.061$) and efficiency of microbial protein synthesis ($P = 0.063$) were not affected by the dietary treatment.

Table 6. Average ($n = 4$) values for the chemical composition of bacterial pellet (TB), creatinine and urinary excretion of purine derivatives, microbial N flow and efficiency in goats fed the experimental diets¹

Item	Diet				SEM ²	P-value
	AC	ACT	ACC	ACB		
DM, g / g fresh matter	0.89	0.89	0.88	0.88	0.009	0.864
Total N, mg / g dry matter	85.1	86.8	88.8	84.4	1.08	0.766
Purine bases, $\mu\text{mol} / \text{g dry matter}$						
Adenine	32.9 ^a	38.6 ^b	31.7 ^a	32.7 ^a	0.124	< 0.001
Guanine	36.4 ^b	38.8 ^b	29.1 ^a	35.5 ^b	0.888	0.022
Total	69.3 ^b	77.4 ^c	60.8 ^a	68.2 ^b	0.886	0.034
Purine bases:N, $\mu\text{mol} / \text{mg}$	0.82 ^b	0.89 ^b	0.69 ^a	0.81 ^b	0.018	0.019
$\mu\text{mol} / \text{kg}^{0.75}$						
Creatinine	249	242	257	311	16.8	0.093
Allantoin	361 ^b	293 ^a	298 ^{ab}	325 ^{ab}	13.6	0.046
Xanthine	14.8	14.4	12.9	13.4	0.65	0.061
Hypoxanthine	14.6 ^{ab}	14.3 ^a	13.9 ^a	17.7 ^b	0.95	0.027
Uric acid	14.7 ^a	14.2 ^a	16.6 ^a	23.0 ^b	0.83	0.033
Total purine derivatives	405 ^b	336 ^a	341 ^{ab}	379 ^{ab}	15.4	0.042
Microbial N flow, g / d	8.70 ^b	6.72 ^a	9.01 ^b	8.36 ^b	0.51	0.030
EMNS ² , g / kg OMAFR	32.8	27.9	36.6	35.7	1.42	0.063

^{ab} Within a row means not bearing a common superscript letter differ ($P < 0.05$).¹AC = Alfalfa hay (25.6 g / kg BW^{0.75} / d) and concentrate (25.6 g / kg BW^{0.75} / d); ACT = Alfalfa hay (25.6 g / kg BW^{0.75} / d), concentrate (12.8 g / kg BW^{0.75} / d) and feed blocks including tomato wastes (15.5 g / kg BW^{0.75} / d); ACC = Alfalfa hay (25.6 g / kg BW^{0.75} / d), concentrate (12.8 g / kg BW^{0.75} / d) and feed blocks including cucumber wastes (13.7 g / kg BW^{0.75} / d); ACB = Alfalfa hay (25.6 g / kg BW^{0.75} / d), concentrate (12.8 g / kg BW^{0.75} / d) and feed blocks including barley (10.6 g / kg BW^{0.75} / d).²SEM = Standard Error of the Mean.³Efficiency of microbial N synthesis; OMAFR = OM apparently fermented in the rumen (65% of digestible OM; ARC, 1984).

Methane emissions, expressed as L per day or per kg BW or kg DM intake was reduced ($P \leq 0.028$) with the inclusion in diet of tomato-based FB (Table 7). The average values for pH ($P = 0.108$) and ammonia concentration ($P = 0.865$) were similar for goats fed the different diets. Total VFA concentration increased ($P = 0.001$) by including tomato and cucumber-based FB without effect of the dietary treatment on molar proportions of acetate ($P = 0.054$), isovalerate ($P = 0.055$) and valerate ($P = 0.482$), increased propionate ($P < 0.001$) with diets including FB, higher ($P = 0.018$) molar proportion of isobutyrate with diet ACT and lower with ACB diet in comparison to AC; butyrate molar proportion decreased ($P = 0.002$) with the inclusion of tomato and cucumber-based FB in diet. The acetate to propionate ratio showed the lowest ($P < 0.001$) values in animals fed diets ACT and ACB.

The abundance of total bacteria was not affected ($P = 0.072$) by diet while the abundance of methanogens was higher ($P = 0.015$) in animals fed diets ACT and ACC in comparison to those fed diets AC and ACB.

DISCUSSION

The shortage of cereals and increased prices (43% from 2008-2009 to 2010-2011; FAO, 2011) are limiting the availability of cereal-based concentrates for animal feeding and, in consequence, increasing the need of alternative and locally available feedstuffs for ruminants. Feed blocks are a simple and cheap technology allowing the high-moisture by-products to be used in ruminant feeding (Ben Salem and Nefzaoui, 2003; Ben Salem and Znaidi, 2008; Molina-Alcaide et al., 2009, 2010a).

Capítulo 4

Table 7. Average (n = 4) values for methane emissions and pH, concentrations of NH₃-N and total and individual VFA and microbial abundances in the rumen of goats fed the experimental diets¹

Item	Diet				SEM ²	P-value
	AC	ACT	ACC	ACB		
Methane emissions						
CH ₄ L / d	18.3 ^b	13.5 ^a	16.2 ^{ab}	16.0 ^{ab}	0.848	0.028
CH ₄ L / kg BW	0.587 ^b	0.420 ^a	0.522 ^{ab}	0.500 ^{ab}	0.028	0.020
CH ₄ L / kg DMI	29.3 ^c	18.5 ^a	25.4 ^b	28.2 ^c	0.330	< 0.001
pH	6.94	7.05	7.09	7.09	0.024	0.108
NH ₃ -N, mg / 100 mL	16.4	15.6	16.3	16.0	0.483	0.865
Total VFA, mmol / L mol / 100 mol	66.9 ^a	80.3 ^b	82.2 ^b	67.2 ^a	2.011	0.001
Acetate	65.1	67.5	69.0	67.3	0.437	0.054
Propionate	13.0 ^a	17.4 ^c	15.1 ^b	16.4 ^{bc}	0.098	< 0.001
Isobutyrate	3.39 ^b	4.20 ^b	3.37 ^{ab}	1.81 ^a	0.114	0.018
Butyrate	12.8 ^b	5.18 ^a	6.59 ^a	9.46 ^{ab}	0.309	0.002
Isovalerate	4.14	4.33	4.11	3.67	0.089	0.055
Valerate	1.59	1.46	1.85	1.41	0.118	0.482
Acetate:propionate	5.03 ^c	3.89 ^a	4.58 ^{bc}	4.12 ^b	0.036	< 0.001
log gen copies / g fresh matter						
Bacteria	11.2	11.4	11.4	11.2	0.058	0.072
Methanogens	8.48 ^a	8.86 ^b	8.85 ^b	8.49 ^a	0.050	0.015

^{abc} Within a row means not bearing a common superscript letter differ ($P < 0.05$).¹AC = Alfalfa hay (25.6 g / kg BW^{0.75} / d) and concentrate (25.6 g / kg BW^{0.75} / d); ACT = Alfalfa hay (25.6 g / kg BW^{0.75} / d), concentrate (12.8 g / kg BW^{0.75} / d) and feed blocks including tomato wastes (15.5 g / kg BW^{0.75} / d); ACC = Alfalfa hay (25.6 g / kg BW^{0.75} / d), concentrate (12.8 g / kg BW^{0.75} / d) and feed blocks including cucumber wastes (13.7 g / kg BW^{0.75} / d); ACB = Alfalfa hay (25.6 g / kg BW^{0.75} / d), concentrate (12.8 g / kg BW^{0.75} / d) and feed blocks including barley (10.6 g / kg BW^{0.75} / d).²SEM= Standard Error of the Mean.

Overall, blocks supply in the present work did not reduce total and alfalfa hay intake, suggesting the absence of substitution effect in agreement to Houmani and Tisserand (1999) and Ben Salem et al. (2001) who did not observe changes in the intake of straw by replacing a part or the concentrate with feed blocks. The average daily intakes of feed blocks in the present study varied from 144 to 203 g per animal and day being similar to values reported by Ben Salem et al. (2000) and Gasmiboubaker et al. (2006a) supplementing grazing goats with FB including olive cake and wheat bran, respectively. Intakes were also in the range of values obtained in cannulated goats fed diets including FB based on crude two-stage olive cake (Molina-Alcaide et al. 2009) but lower than those found by Ben Salem and Znaidi (2008) in lambs which the diets included tomato pulp and olive cake-based FB. The variability in block intakes in sheep and goats was reported by Sansoucy (1986) and may rely upon FB formulation and other factors such as animal physiological state or breed. Whether FB reduce or not feeding cost and increase incomes in goat production are key questions. Taking into account the amount of cereals included in the concentrate and in FB used in the present work, the average intakes and the cost of diet ingredients a reduction in feeding cost by 32% may be achieved with FB containing diets in agreement with others (El Hag et al., 2002; Ben Salem and Znaidi, 2008; Molina-Alcaide et al., 2010a).

Our results agree those reported by Ben Salem and Znaidi (2008) who noted that partial replacement of concentrate with either olive cake or tomato pulp-based FB decreased DM and OM digestibility of straw-based diets given to Barbarine lambs. In general, it is accepted that increased levels of concentrate in ruminant diets lead to higher DM and OM digestibility (Molina-Alcaide et al., 2000; Fimbres et al., 2002) in agreement with our results. In this experiment, the lack of differences in fiber digestibility in animals fed diets including FB may be explained by both pH values not so low to negatively affect fiber degradation in the rumen and the lack of differences due to the diet in total bacteria abundance in the rumen. Although pH was not affected by diet, VFA concentration in the rumen of goats fed diets including tomato or cucumber-based FB showed higher values than those obtained in goats fed diets AC and ACB. These contradictory results regarding pH and VFA concentration in rumen are difficult to explain and disagree with observations relying increased VFA concentration in rumen with increased concentrate in diet (Antonioni and Hadjipanayiotou, 1985). Ruminant pH values were similar to those found by Morales et al. (2000) in goats grazing on shrubs and supplemented with urea-molasses-based blocks. Also, Moujahed et al. (2000) indicated that rumen pH conditions were optimum for

microbial activity when penned sheep fed *Acacia cyanophylla* received FB. The level of concentrate (Andrade and Schmidely, 2006; Tripathi et al., 2007; Zebeli et al., 2008) and the buffer properties attributed to leguminous forages like alfalfa (Dixon and Stockdale, 1999) could contribute to the lack of variations in rumen pH with dietary treatments in the present work. Total VFA concentration in the rumen of goats was within the range of values previously reported for Granadina and Saanen goats fed diets based on alfalfa hay (Molina-Alcaide et al., 2000; Fujita et al., 2006) and higher than values found in goats fed diets including olive cake-based FB (Molina-Alcaide et al., 2009). Available information concerning the effect of FB on ruminal VFA concentration is contradictory since some authors did not find changes in goat fed poor-quality roughages (Samanta et al., 2003) or alfalfa-concentrate based diets (Molina-Alcaide et al., 2009) while others (Sudana and Leng, 1986; Doyle et al., 1988) found a wide variation in lambs fed diets supplemented with urea-molasses FB and concentrate, respectively. The lower VFA concentration in the rumen of goats fed diets including barley-based FB may be due to the lower intakes of this type of FB compared with the other tested diets. Additionally, concentrate replacement with FB in diets decreased butyrate molar proportion, in agreement with Getachew et al. (2004), who observed a positive correlation between the level of non structural carbohydrate in diet and butyrate production which probably promoted increased concentration and/or activity of butyrate-producing bacteria (Carro and Ranilla, 2003). Isobutyrate and isovalerate molar proportions, which arise from the degradation of dietary valine and leucine, respectively, by ruminal bacteria (Vlaeminck et al., 2006) were markedly reduced in goats fed ACB diet. Thus, barley-based FB would compromise the fermentation of these amino acids.

Digestible energy decreased with the diet including barley-based FB compared with the control one with the highest amount of concentrate which agrees previous observations (Cerrillo et al., 1999; Islam et al., 2000; Tovar-Luna et al., 2007). However, metabolizable energy was similar for all the dietary treatments because energy in faeces of animals producing less methane was higher than in animals with more methane emissions. Therefore, as non productive animals, the energy saved in goats fed diet including tomato-based FB through the reduction of methane synthesis in the rumen was not fully exploited by the animal but lost in faeces.

The inclusion of wastes from greenhouse horticulture in FB did not compromise either N intake or utilization promoting N excretion in faeces and urine similar to

those from animals fed control and barley-based FB diets, the last additionally decreased N utilization, which has important environmental implications. Ben Salem and Znaidi (2008) did not find any effect of either concentrate replacement or type of FB on N balance and digestibility in Barbarine lambs. The CP apparent digestibility observed in goats fed diets containing wastes fruits-based FB was higher than values obtained in Awassi sheep fed diets containing 34% of tomato pomace or olive cake (Abbeddou et al., 2011). The N balances observed in the present study were in the range of values found by others in goats fed at maintenance level (Pralomkarn et al., 1995; Fujita et al., 2006; Yáñez-Ruiz and Molina-Alcaide, 2007). Rumen concentrations of $\text{NH}_3\text{-N}$ were similar for all the experimental diets and higher than values reported by Gasmiboubaker et al. (2006b) in grazing goats fed a diet containing urea-molasses FB. Creatinine excretion varied from 242 to 311 $\mu\text{mol/kg BW}^{0.75}$, which was within the range of values reported for goats fed at maintenance level by Belenguer et al. (2002) and lower than those obtained by Chen et al. (1992) and (Yáñez Ruiz et al. 2004a, b) in sheep and goats fed at maintenance level, respectively. In the current study, goats receiving diets including FB excreted less PD (0.81 times) than those receiving the control diet. Our values for total urinary PD excretion in animals fed the experimental diets were lower than those obtained by Belenguer et al. (2002) in Granadina goats fed alfalfa hay at maintenance level (701 $\mu\text{mol PD/kg BW}^{0.75}$), and slightly lower than those obtained by Cantalapiedra-Hijar et al. (2009) in cannulated Granadina goats fed grass hay and concentrate (70:30) at maintenance level (462 $\mu\text{mol PD/kg BW}^{0.75}$). However, OM intakes were slightly higher in both reported studies than in the present experiment. Additionally, high concentrate diet (AC) led to greater OM digestibility than diets including FB, supporting the relationship between urinary PD excretion and DOMI reported by Chen et al. (1992) and Perez et al. (1998). High variability in MNF and efficiency of microbial protein synthesis in the rumen has been reported (Yáñez Ruiz et al., 2004c; Cantalapiedra-Hijar et al., 2009; Molina-Alcaide et al., 2009) and associated with both the bacterial pellet used as reference to estimate MNF and the method used to isolate pellets. The average values of PB:N ratio (0.80 $\mu\text{mol / mg}$) in bacterial pellet used for estimating MNF in the present work were lower than those obtained by Belenguer et al. (2002) in goats fed alfalfa hay at maintenance level (1.92 $\mu\text{mol / mg}$) and by Chen et al. (1992) in sheep (1.66 $\mu\text{mol / mg}$) but they are in the range of values obtained in liquid and solid-associated bacteria by Molina-Alcaide et al. (2009, 2010a,b). Obispo and Dehority (1999) suggested that mixed ruminal bacteria may be contaminated with feed

Capítulo 4

particles containing protein, which would result in an overestimation of MNF due to a lower PB:N ratio. In addition, the observed PB:N values were different from those reported in the literature, which underlines the need for these parameters to be analyzed directly in pellets isolated from specific animals and experimental conditions as suggested by Cantalapiedra-Hijar et al. (2009). Our results support the statement of Obispo and Dehority (1999) concerning the association between changes in PB concentration in bacterial pellets and the presence in pellets of different bacterial species with different growth rates as diets promoting differences in PB content in pellets did not affect the abundance of total bacteria. Since ammonia concentration in the rumen and the energy and N utilization were not affected by the inclusion of wastes from greenhouse horticulture in FB no differences in MNF due to the inclusion of those FB in diet should be expected as microbial N flow relies upon the synchronised and fractionated supply of nutrients to microorganisms (Bach et al., 2005). However, diet including tomato-based FB decreased MNF (23, 25 and 20 % compared to diets AC, ACC and ACB, respectively). Furthermore, low protein availability and nutritive value of tomato was reported by Cone and van Gelder (1999) and Ventura et al. (2009). The quality of energy and nitrogen sources included in the three types of feed blocks can influence digestibility and N and E utilization.

Diet including tomato-based FB decreased methane emission by 37, 27 and 34 %, compared to diets AC, ACC and ACB, respectively. There is an increasing interest in the study of antimethanogenic compounds in order to reduce livestock greenhouse gases emissions and improve the efficiency of energy utilization in ruminants. There is no information regarding the effect of vegetal by-products and wastes-based FB on methane emissions. Feed blocks including tomato fruit wastes might have an added value derived from the presence of polyphenols (19.9 g / kg DM of total condensed tannins) or other plant secondary compounds which could act as natural safe antimethanogenics alternative to the chemical ones as suggested by Patra and Saxena (2010). The results of the present study could support previous speculations concerning the association between the antimethanogenic effect of plant secondary compounds and their molecular structure and weight together with chemical composition of diets (Newbold et al., 2004; Vasta et al., 2009), since tomato and cucumber-based blocks showed close tannins content values but different effects on methanogenesis. The average values for methane emissions (L / kg DMI) with the experimental diets were in the line of those obtained using respiration

chambers in sheep fed different practical diets (Blaxter and Clapperton, 1965; Pinares-Patiño et al., 2007). Similar values were also found in goats treated with bromochloromethane with proved antimethanogenic activity (Abecia et al., 2011). An additional advantage of the strategy involving the replacement of 50% of concentrate with feed blocks including tomato rely to the lack of effect on DMI that decreased with other antimethanogenic strategies (Beauchemin et al., 2008). Contrarily to our findings other authors did not find any relationship between the antimethanogenic effect of some plant compounds and the methanogens abundance (Nollet et al., 1998; Machmulleret al., 2003; Yáñez-Ruiz et al., 2008). To explain the lack of changes in methanogens abundance with different methane emissions it has been hypothesized that rather than the number is the species composition of archaea community what drives the synthesis of methane in the rumen (Morgavi et al., 2010; Zhou et al., 2010) but it still remains unknown which genera or species of archaea are more involved in ruminal methane production (Yu and Morrison, 2004b). Our results concerning microbial abundances were within physiological values in the rumen (Kumar et al., 2009).

The reduction in acetate:propionate ratio due to concentrate replacement with FB and specially with tomato-based FB is in agreement with previous observations with synthetic antimethanogenics additives (Denman et al., 2007; Abecia et al., 2011) and indicates a redirection of hydrogen from methane to more propionic metabolic pathways (McAllister and Newbold, 2008). Pyruvate is reduced to propionate in a two-multi step pathway that results in less hydrogen production and hence decreased methane synthesis (Janssen, 2010).

In conclusion, the replacement of 50% of concentrate in diets based on alfalfa hay for non-productive goats with feed blocks including wastes of tomato or cucumber fruits decreased feeding cost and did not compromise N and energy digestive and metabolic utilization. A better fermentation pattern and increased abundances on methanogenic archaea was promoted in the rumen of goats supplemented with wastes-based feed blocks. However, feed blocks including barley compromised nutrients and energy utilization and promoted worse fermentation pattern than feed blocks including waste fruits. Diet including tomato-based FB decreased MNF without affecting the efficiency of synthesis but it decreased methane emission by 33% compared to the other studied diets. This dietary approach involves the use of agricultural by-products and reduced methane emissions which represents advantages against approaches using antibiotics or other

chemicals potentially harmful to the animal or the environment. Further research is needed to understand the mechanisms involved in the antimethanogenic effect of tomato-based FB in order to improve ruminal protein yield and energy utilization which may limit the use of this type of blocks in non-productive ruminants practical feeding. Further research is needed as well to state the effect of tomato and cucumber-based FB on ruminant products quality.

LITERATURE CITED

- Abbeddou, S., S. Riwhi, L. Iñiguez, M. Zaklouta, H. D. Hess, and M. Kreuzer. 2011. Ruminal degradability, digestibility, energy content, and influence on nitrogen turnover of various Mediterranean by-products in fat-tailed Awassi sheep. *Anim Feed Sci Tech.* 163: 99-110.
- Abecia, L., P. G. Toral, A. I. Martín-García, G. Martínez, N. W. Tomkins, E. Molina-Alcaide, C. J. Newbold, and D. R. Yáñez-Ruiz. 2011. Effect of bromochloromethane on methane emission, rumen fermentation pattern, milk yield, and fatty acid profile in lactating dairy goats. *J Dairy Sci.* <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2011-4831>.
- Andrade, P. V. D., and P. Schmidely. 2006. Influence of percentage of concentrate in combination with rolled canola seeds on performance, rumen fermentation and milk fatty acid composition in dairy goats. *Livest Sci.* 104: 77-90.
- Antoniou, T., and M. Hadjipanayiotou. 1985. The digestibility by sheep and goats of five roughages offered alone or with concentrates. *J Agr Sci.* 105: 663-671.
- AOAC. 2005. Official Methods of Analysis. 18th ed. Assoc. Off. Anal. Chem. Gaithersburg, MD, USA.
- ARC. 1984. The Nutrient Requirement of Ruminant Livestock (No.1). Commonw. Agric. Bureaux, Slough, UK.
- Bach, A., S. Calsamiglia, and M. D. Stern. 2005. Nitrogen metabolism in the rumen. *J Dairy Sci.* 88: 9-21.
- Balcells, J., and J. Guada. 1992. Simultaneous determination of allantoin and oxypurines in biological fluids by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr.* 575: 153-157.
- Beauchemin, K. A., M. Kreuzer, F. O'mara, and T. A. McAllister. 2008. Nutritional management for enteric methane abatement: a review. *Aust J Exp Agr.* 48: 21-27.
- Belenguer, A., D. Yáñez, J. Balcells, N. H. Ozdemir Baber, and M. Gonzalez Ronquillo. 2002. Urinary excretion of purine derivatives and prediction of rumen microbial outflow in goats. *Livest Prod Sci.* 77: 127-135.
- Ben Salem, H., A. Nefzaoui, and L. Ben Salem. 2000. Supplementing range goats in Central Tunisia with feed blocks or a mixture of *Opuntia ficus indica* var. *inermis* and *Atriplex nummularia*. Effects on behavioural activities and growth. Proc. 7th International Conference on Goats., France: 988-989.
- Ben Salem, H., and A. Nefzaoui. 2003. Feed blocks as alternative supplements for sheep and goats. *Small Ruminant Res.* 49: 275-288.
- Ben Salem, H., and I. A. Znaidi. 2008. Partial replacement of concentrate with tomato pulp and olive cake-based feed blocks as supplements for lambs fed wheat straw. *Anim Feed Sci Tech.* 147: 206-222.
- Blaxter, K. L., and J. L. Clapperton. 1965. Prediction of the amount of methane produced by ruminants. *Brit J Nutr.* 19: 511-522.
- Cantalapiedra-Hijar, G., D. R. Yáñez-Ruiz, A. I. Martín-García, and E. Molina-Alcaide. 2009. Effects of forage:concentrate ratio and forage type on apparent digestibility, ruminal fermentation, and microbial growth in goats. *J Anim Sci.* 87: 622-631.
- Carro, M. D., and M. J. Ranilla. 2003. Effect of the addition of malate on in vitro rumen fermentation of cereal grains. *Brit J Nutr.* 89: 181-188.
- Cerrillo, M. A., J. R. Russell, and M. H. Crump. 1999. The effects of hay maturity and forage to concentrate ratio on digestion kinetics in goats. *Small Ruminant Res.* 32: 51-60.
- Chen, X. B., Y. K. Chen, M. F. Franklin, E. R. Orskov, and W. J. Shand. 1992. The effect of feed intake and body weight on purine derivative excretion and microbial protein supply in sheep. *J Anim Sci.* 70: 1534-1542.
- Christophersen, C. T. 2007. Ph.D. thesis. University of Western Australia, Perth.
- Cone, J., and A. Van Gelder. 1999. Influence of protein fermentation on gas production profiles. *Anim Feed Sci Tech.* 76: 251-264.
- Denek, N., and A. Can. 2006. Feeding value of wet tomato pomace ensiled with wheat straw and wheat grain for Awassi sheep. *Small Ruminant Res.* 65: 260-265.
- Denman, S. E., and C. S. McSweeney. 2006. Development of a real-time PCR assay for monitoring anaerobic fungal and cellulolytic bacterial populations within the rumen. *FEMS Microbiol Ecol.* 58: 572-582.
- Denman, S. E., N. W. Tomkins, and C. S. McSweeney. 2007. Quantitation and diversity analysis of ruminal methanogenic populations in response to

Capítulo 4

- the antimethanogenic compound bromochloromethane. *FEMS Microbiol Ecol.* 62: 313-322.
- Dixon, R., and C. Stockdale. 1999. Associative effects between forages and grains: consequences for feed utilisation. *Aust J Agr Res.* 50: 757-774.
- Doyle, P.T., H. Dove, M. Freer, F. J. Hart, R. M. Dixon, and A. R. Egan. 1988. Effects of a concentrate supplement on the intake and digestion of a low-quality forage by lambs. *J Agr Sci.* 111: 503-511.
- FAO. 2010. *Crop Prospects and Food Situation*, No. 4, December 2011. <http://www.fao.org/giews/english/cpfs/index.htm>.
- Fimbres, H., J. R. Kawas, G. Hernández-Vidal, J. F. Picón-Rubio, and C. D. Lu. 2002. Nutrient intake, digestibility, mastication and ruminal fermentation of lambs fed finishing ration with various forage levels. *Small Ruminant Res.* 43: 275-281.
- Fondevila, M., J. A. Guada, J. Gasa, and C. Castrillo. 1994. Tomato pomace as a protein supplement for growing lambs. *Small Ruminant Res.* 13: 117-126.
- Fujita, T., M. Kajita, and H. Sano. 2006. Responses of whole body protein synthesis, nitrogen retention and glucose kinetics to supplemental starch in goats. *Comp Biochem Phys B.* 144: 180-187.
- Gasmiboubaker, A., C. Kayouli, and A. Buldgen. 2006a. Feed blocks as a supplement for goat kids grazing natural Tunisian rangeland during the dry season. *Anim Feed Sci Tech.* 126: 31-41.
- Gasmiboubaker, A., C. Kayouli, A. Buldgen, A. Boukary, H. Ammar, and S. Lopez. 2006b. Effect of feed block supply on the ruminal ecosystem of goats grazing shrub land in Tunisia. *Anim Feed Sci Tech.* 127: 1-12.
- Getachew, G. 2004. Relationships between chemical composition, dry matter degradation and in vitro gas production of several ruminant feeds. *Anim Feed Sci Tech.* 111: 57-71.
- El Hag, M. G., M. A. Al-Merza, and B. A. Salti. 2002. Growth in the Sultanate of Oman of small ruminants given date byproducts-urea multinutrient blocks. *Asian Austral J Anim.* 15: 671-674.
- Hook, S.E., A. D. G. Wright, and B. W. McBride. 2010. Methanogens: Methane Producers of the Rumen and Mitigation Strategies. *Archaea*. doi:10.1155/2010/945785.
- Houmani, M., and J. L. Tisserand. 1999. Complémentation d'une paille de blé avec des blocs multinutritionnels: effets sur la digestibilité de la paille et intérêt pour des brebis taries et des agneaux en croissance. *Ann Zootech.* 48: 199-209.
- INRA. 1988. Jarrige, R. (Ed.), *Alimentation des Bovins, Ovins et Caprins*. INRA, Paris. 476.
- Isac, M. D., M. A. García, J. F. Aguilera, and E. Molina-Alcaide. 1994. A comparative study of nutrient digestibility, kinetics of digestion and passage and rumen fermentation pattern in goats and sheep offered medium quality forages at the maintenance level of feeding. *Arch. Tierernahr.* 46: 37-50.
- Islam, M., H. Abe, Y. Hayashi, and F. Terada. 2000. Effects of feeding Italian ryegrass with corn on rumen environment, nutrient digestibility, methane emission, and energy and nitrogen utilization at two intake levels by. *Small Ruminant Res.* 38: 165-174.
- Janssen, P. H. 2010. Influence of hydrogen on rumen methane formation and fermentation balances through microbial growth kinetics and fermentation thermodynamics. *Anim Feed Sci Tech.* 160: 1-22.
- Johnson, K.A. and D. E. Johnson. 1995. Methane emissions from cattle Methane Emissions from Cattle. *J Anim Sci.* 73: 2483-2492.
- Kumar, S., A. K. Puniya, M. Puniya, S. S. Dagar, S. K. Sirohi, K. Singh, and G. W. Griffith. 2009. Factors affecting rumen methanogens and methane mitigation strategies. *J Microbiol Biotechn.* 25: 1557-1566.
- Machmuller, A., C. R. Soliva, and M. Kreuzer. 2003. Effect of coconut oil and defaunation treatment on methanogenesis in sheep. *Reprod Nutr Dev.* 43: 41-56.
- MARM. 2009. Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino. *Anuario de Estadística*. http://www.mapa.es/estadistica/pags/anuario/2009/Anuario_2009.pdf.
- McAllister, T. A., and C. J. Newbold. 2008. Redirecting rumen fermentation to reduce methanogenesis. *Aust J Exp Agr.* 48: 7-13.
- Michalet-Doreau, B., and M. Y. Ould-Bah. 1992. Influence of hay making on in situ nitrogen degradability of forages in cows. *J Dairy Sci.* 75: 782-788.
- Molina-Alcaide, E., A. I. García Martín, and J. F. Aguilera. 2000. A comparative study of nutrient digestibility, kinetics of degradation and passage and rumen fermentation pattern in goats and sheep offered good quality diets. *Livest Prod Sci.* 64: 215-223.
- Molina-Alcaide, E., M. R. Pascual, G. Cantalapiedra-Hijar, E. Y. Morales-García, and A. I. Martín-García. 2009. Effects of concentrate replacement by feed blocks on ruminal fermentation and microbial growth in goats and single-flow

- continuous-culture fermenters. *J Anim Sci.* 87: 1321-1333.
- Molina-Alcaide, E., E. Y. Morales-García, A. I. Martín-García, H. Ben Salem, A. Nefzaoui, and M. R. Sanz-Sampelayo. 2010a. Effects of partial replacement of concentrate with feed blocks on nutrient utilization, microbial N flow, and milk yield and composition in goats. *J Dairy Sci.* 93: 2076-2087.
- Molina-Alcaide, E., A. I. Martín-García, A. Moumen, and M. D. Carro. 2010b. Ruminal fermentation, microbial growth and amino acid flow in single-flow continuous culture fermenters fed a diet containing olive leaves. *J Anim Physiol An N.* 94: 227-236.
- Morales, A. R., M. A. Galina, S. Jimenez, and G. F. W. Haenlein. 2000. Improvement of biosustainability of a goat feeding system with key supplementation. *Small Ruminant Res.* 35: 97-105.
- Morgavi, D. P., E. Forano, C. Martin, and C. J. Newbold. 2010. Microbial ecosystem and methanogenesis in ruminants. *Animal.* 4: 1024-1036.
- Moujahed, N., C. Kayouli, A. Thewis, Y. Beckers, and S. Rezgui. 2000. Effects of multinutrient blocks and polyethylene glycol 4000 supplies on intake and digestion by sheep fed *Acacia cyanophylla* Lindl. foliage-based diets. *Anim Feed Sci Tech.* 88: 219-238.
- Newbold, C. J., F. M. McIntosh, P. Williams, R. Losa, and R. J. Wallace. 2004. Effects of a specific blend of essential oil compounds on rumen fermentation. *Anim Feed Sci Tech.* 114: 105-112.
- Newbold, C. J., S. López, N. Nelson, J. O. Ouda, R. J. Wallace, and A. R. Moss. 2007. Propionate precursors and other metabolic intermediates as possible alternative electron acceptors to methanogenesis in ruminal fermentation in vitro. *Brit J Nutr.* 94: 27-35.
- Nollet, L., L. Mbanzamihigo, D. Demeyer, and W. Verstraete. 1998. Effect of the addition of *Peptostreptococcus productus* ATCC 35244 on reductive acetogenesis in the ruminal ecosystem after inhibition of methanogenesis by cell-free supernatant of *Lactobacillus plantarum* 80. *Anim Feed Sci Tech.* 71: 49-66.
- Obispo, N., and B. Dehority. 1999. Feasibility of using total purines as a marker for ruminal bacteria. *J Anim Sci.* 77:3084-3095.
- Patra, A. K., and J. Saxena. 2010. A new perspective on the use of plant secondary metabolites to inhibit methanogenesis in the rumen. *Phytochemistry.* 71: 1198-1222.
- Perez, J. F., J. Balcells, J. A. Cebrian, and S. M. Martín-Orúe. 1998. Excretion of endogenous and exogenous purine derivatives in sheep: effect of increased concentrate intake. *Brit J Nutr.* 79: 237-240.
- Perez-Maldonado, R. A., and B. W. Norton. 1996. Digestion of ¹⁴C-labelled condensed tannins from *Desmodium intortum* in sheep and goats. *Brit J Nutr.* 76: 501-513.
- Pinares-Patiño, C. S., C. W. Holmes, K. R. Lassey, and M. J. Ulyatt. 2007. Measurement of methane emission from sheep by the sulphur hexafluoride tracer technique and by the calorimetric chamber: failure and success. *Animal.* 2: 141-148.
- Pralomkarn, W., S. Kochapakdee, S. Saithanoo, and B. W. Norton. 1995. Energy and protein utilisation for maintenance and growth of Thai native and Anglo-Nubian x Thai native male weaner goats. *Small Ruminant Res.* 16: 13-20.
- Prieto, C., J. F. Aguilera, L. Lara, and J. Fonollá. 1990. Protein and energy requirements for maintenance of indigenous Granadina goats. *Brit J Nutr.* 63: 155-163.
- Samanta, A. K., K. K. Singh, M. M. Das, S. B. Maity, and S. S. Kundu. 2003. Effect of complete feed block on nutrient utilisation and rumen fermentation in Barbari goats. *Small Ruminant Res.* 48: 95-102.
- Sansoucy, R., 1986. The Sahel: manufacture and molasses-urea blocks. *World Anim. Rev.* 57: 40-48.
- Scollan, N., P. Greenwood, C. Newbold, D. Yáñez Ruiz, K. Shingfiel, R. Wallace, and J. Hocquette. 2011. Future research priorities for animal production in a changing world. *Anim Prod Sci.* 51: 1-5.
- Van Soest, P. J., J. B. Robertson, and B. A. Lewis. 1991. Methods for Dietary Fiber, Neutral Detergent Fiber, and Nonstarch Polysaccharides in Relation to Animal Nutrition. *J Dairy Sci.* 74: 3583-3597.
- Sudana, I. B., and R. A. Leng. 1986. Effects of supplementing a wheat straw diet with urea or a urea-molasses block and/or cottonseed meal on intake and liveweight change of lambs. *Anim Feed Sci Tech.* 16: 25-35.
- Tovar-Luna, I., A. L. Goetsch, R. Puchala, T. Sahlú, G. E. Carstens, H. C. Freetly, and Z. B. Johnson. 2007. Effects of moderate feed restriction on energy expenditure by 2-year-old crossbred Boer goats. *Small Ruminant Res.* 72: 25-32.
- Tripathi, M., O. Chaturvedi, S. Karim, V. Singh, and S. Sisodiya. 2007. Effect of different levels of concentrate allowances on rumen fluid pH, nutrient digestion, nitrogen retention and growth

Capítulo 4

- performance of weaner lambs. *Small Ruminant Res.* 72: 178-186.
- Vasta, V., H. P. S. Makkar, M. Mele, and A. Priolo. 2009. Ruminal biohydrogenation as affected by tannins in vitro. *Brit J Nutr.* 102: 82-92.
- Ventura, M. R., M. C. Pieltain, and J. I. R. Castanon. 2009. Evaluation of tomato crop by-products as feed for goats. *Anim Feed Sci Tech.* 154: 271-275.
- Vlaeminck, B., V. Fievez, S. Tamminga, R. J. Dewhurst, A. Van Vuuren, D. Brabander, and D. Demeyer. 2006. Milk odd- and branched-chain fatty acids in relation to the rumen fermentation pattern. *J Dairy Sci.* 89: 3954-3964.
- Weatherburn, M. W. 1967. Phenol-hypochlorite reaction for determination of ammonia. *Anal Chem.* 39: 971-974.
- Wright, A. D. G., and A. V. Klieve. 2011. Does the complexity of the rumen microbial ecology preclude methane mitigation?. *Anim Feed Sci Tech.* 166-167: 248-253.
- Yáñez-Ruiz, D. R., A. I. Martín García, A. Moumen, and E. Molina-Alcaide. 2004a. Ruminal fermentation and degradation patterns, protozoa population and urinary purine derivatives excretion in goats and wethers fed diets based on olive leaves. *J Anim Sci.* 82: 3006-3014.
- Yáñez Ruiz, D. R., A. Moumen, A. I. Martín García, and E. Molina-Alcaide. 2004b. Ruminal fermentation and degradation patterns, protozoa population, and urinary purine derivatives excretion in goats and wethers fed diets based on two-stage olive cake: Effect of PEG supply. *J Anim Sci.* 82: 2023-2032.
- Yáñez Ruiz, D. R., A. Moumen, A. I. Martín García, and E. Molina-Alcaide. 2004c. Comparative studies on microbial protein synthesis in the rumen of goats and sheep. *J Anim Feed Sci.* 1: 251-254.
- Yáñez-Ruiz, D. R., and E. Molina-Alcaide. 2007. A comparative study of the effect of two-stage olive cake added to alfalfa on digestion and nitrogen losses in sheep and goats. *Animal.* 1: 227-232.
- Yáñez-Ruiz, D. R., K. J. Hart, A. I. Martín-García, S. Ramos, and C. J. Newbold. 2008. Diet composition at weaning affects the rumen microbial population and methane emissions by lambs. *Aust J Exp Agr.* 48: 186-188.
- Yu, Z., and M. Morrison. 2004a. Improved extraction of PCR-quality community DNA from digesta and fecal samples. *BioTechniques.* 36: 808-812.
- Yu, Z., and M. Morrison. 2004b. Comparisons of different hypervariable regions of rrs genes for use in fingerprinting of microbial communities by PCR-denaturing gradient gel electrophoresis. *Appl Environ Microb.* 70: 4800-4806.
- Zebeli, Q., J. Dijkstra, M. Tafaj, H. Steingass, B. N. Ametaj, and W. Drochner. 2008. Modeling the adequacy of dietary fiber in dairy cows based on the responses of ruminal pH and milk fat production to composition of the diet. *J Dairy Sci.* 91: 2046-2066.
- Zhou, M., E. Hernandez-Sanabria, and L. L. Guan. 2010. Characterization of variation in rumen methanogenic communities under different dietary and host feed efficiency conditions, as determined by PCR-denaturing gradient gel electrophoresis analysis. *Appl Environ Microb.* 76: 3776-3786.

Publicación 3

**Nutrient Utilization, Ruminant Fermentation, Microbial
Abundances and Milk Yield and Composition in Dairy Goats Fed
Diets Including Tomato and Cucumber Waste Fruits**

M. Romero-Huelva, E. Ramos-Morales and E. Molina-Alcaide

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

(Enviado a Journal of Dairy Science)

Capítulo 4

ABSTRACT. The effects of replacing 35% of cereals-based concentrate with feed blocks (FB) including waste fruits of tomato, cucumber or barley grain in diet for lactating goats on nutrient utilization, ruminal fermentation, microbial N flow to the duodenum, milk yield and quality, methane emissions and abundances of total bacteria and methanogens were studied. Eight Murciano-Granadina goats (39.4 ± 5.39 kg BW) in the middle of the third lactation were used and 4 diets were studied in a 4 x 4 Latin square experimental design. Diets consisted of alfalfa hay (A) plus concentrate (C) in a 1:1 ratio (diet AC) or diets in which 35% of the concentrate was replaced with FB including wastes of tomato fruit (diet ACT), cucumber (diet ACC) or barley (diet ACB). In each period 2 goats were randomly assigned to one of the dietary treatments. The intakes of FB including tomato, cucumber and barley were 208 ± 65 , 222 ± 52 and 209 ± 83 g of dry matter per animal and day, respectively. The replacement of 35% of concentrate with FB did not compromise nutrient apparent digestibility, total purine derivatives urinary excretion, milk yield and composition, and total bacteria and methanogens abundances. Digestible energy and that in methane and urine were higher for AC than for FB-containing diets, whereas ME value was not affected by diet. The inclusion of tomato and cucumber fruits in FB decreased N in urine and CH₄ emissions, compared with AC, which is environmentally important. However, tomato-based FB decreased microbial N flow and efficiency of microbial protein synthesis in the rumen, whereas goats fed cucumber-based FB had the highest values for both measurements. Moreover, FB containing barley or tomato and cucumber lead to lower rumen VFA and NH₃-N concentrations, respectively. Milk from goats fed diets including tomato and cucumber-based FB had higher linoleic, linolenic and total PUFA concentrations than that from goats fed AC. Overall, our study suggests that tomato and cucumber FB could replace 35% of the concentrate in dairy goat diet reducing animal feeding cost and methane production, leading to higher PUFA proportion in milk and without compromising nutrient utilization or milk yield.

Key Words: goat milk, tomato and cucumber, methane.

INTRODUCTION

In Mediterranean countries, ruminant production is limited by poor quality and scarcity of pastures especially during the drought periods. As a consequence, breeders are forced to use expensive cereal-based concentrates. Moreover, the intensification in dairy goat production systems during the last decade makes them strongly dependent on concentrates. Increases in cereal prices (43% from 2008 to 2011; FAO, 2011) has driven the attention of ruminant nutritionists toward local alternative feedstuffs (Ben Salem, 2010; Molina-Alcaide et al., 2010) in order to reduce production costs. By-products from agriculture may be of interest not only for reducing feeding cost but also to reduce environmental problems associated with by-products accumulation (Vasta et al., 2008). In the Mediterranean area, greenhouse horticulture represents about 15% of the world production, Spain being the main producer. This horticulture generates huge amounts of wastes, mainly from tomato and cucumber fruits (about 350,000 and 60,500 Tm/year, respectively). Although, these wastes are available during the whole year, amounts can vary among seasons. To our knowledge, the use of

tomato by-products for ruminant feeding has been explored (Ben Salem and Znaidi, 2008) but no information is available regarding the inclusion of cucumber in ruminant diets. As tomato and cucumber have high moisture content, their inclusion in FB would prevent the loss of the nutrients that remain soluble and allow their long term conservation (Ben Salem and Nefzaoui, 2003).

Nowadays there is an increased interest on the development of dietary strategies that could reduce methane emissions by ruminants (Martín et al., 2010). Methane is an important greenhouse gas, which represents a significant energy loss for the animal (2 to 12% of the gross energy intake). Additionally, research has been focused on feed additives or diet ingredients that could reduce the formation of saturated FA and increase the concentration of unsaturated FA in ruminant products. As far as we know, few studies have investigated the effect of strategies based on the use of by-products on milk FA composition (Molina-Alcaide et al., 2010; Modaresi et al., 2011) or methane emissions by ruminants.

Our hypothesis is that tomato and cucumber waste fruits could be ingredients of multinutrient blocks used to partially replace cereal-based

concentrates in lactating goat diets without compromising ruminal fermentation and microbiota, reducing methane emissions and improving the quality of the milk FA profile. The aim of the present work was to study, in dairy goats, the effect of replacing a cereal-based concentrate with FB on milk yield and composition, nutrient utilization, methane emissions and bacteria and methanogens abundances.

MATERIAL AND METHODS

Animals, Wastes and Diets

Eight Murciano-Granadina goats (39.4 ± 5.39 kg BW) in the middle of the third lactation were used (50 days in milk at the beginning of the experiment). Animals were placed in individual boxes and had free access to water. Animals were cared and handled in accordance with the Spanish guidelines for experimental animal protection (Royal Decree 1201/2005 of October 10 on the protection of animals used for experimentation or other scientific purposes) in line with the European Convention for the Protection of Vertebrates used for Experimental and other Scientific Purposes (European Directive 86/609).

Tomato and cucumber wastes were collected at the Wastes Treatment Factory in Motril (Granada, Spain), homogenized using a commercial blender (DANAMIX Model TR330, Fordingbridge, UK) and kept at -20°C before used for FB preparation. Block manufacturing followed the protocol of Molina-Alcaide et al. (2010) with some modifications. For FB manufacturing, solid ingredients were ground (4 mm) and mixed in a horizontal mixer (P. Prat model C, Sabadell, Spain), with a liquid mixture composed of water, quicklime, salt, beet molasses, urea, and tomato or cucumber waste fruits (585 g/kg fresh matter FB) and then high-pressure packed in aluminium molds. Compacted blocks were taken out from the mold and air-dried within three to eight days and stored until distribution to the animals.

Four experimental diets were formulated with 1kg alfalfa hay (**A**) plus 1 kg concentrate (**C**) (diet **AC**), and alfalfa hay, concentrate and FB (Table 1) containing wastes of tomato (diet **ACT**) and cucumber (diet **ACC**) fruits or barley (diet **ACB**) which replaced 35% of the concentrate in the control diet. The specific N and energy requirements

of this breed (Aguilera et al., 1990) were considered in the dietary formulation. The amount of alfalfa hay and concentrate supplied to the animals fed AC were sufficient to allow daily milk production of up to 2 kg per goat. All diets were supplied once daily.

Experimental Procedure

Four 39-d periods were carried out in a replicated 4 x 4 Latin square and experimental treatments were randomly assigned within each square, with 8 replications for each diet at the end of the trial. Animals were separated into 4 homogeneous groups based on body weight and milk yield, and were fed once a day at 0900 h, being all samples collected before feeding time. After 25-d of adaptation to the corresponding experimental diet animals were moved to individual metabolism crates. After 3-d of adaptation to metabolism crates, total feces and urine were collected for 5 d. Individual intakes of diet ingredients were registered throughout the whole trial. No refusals were observed for concentrate. Feed blocks were supplied ad libitum, resulting in average intakes of 208 ± 65 , 222 ± 52 and 209 ± 83 g of dry matter/animal per day for FB based on tomato, cucumber and barley, respectively. During the sampling period, alfalfa hay and FB refusals from each animal were collected and weighted daily, then pooled, and stored at -20°C . Urine was collected in buckets with 10% HCl (vol/vol) to maintain pH below 3 and avoid N losses. Aliquots (100 mL) of urine were taken for density measurement and analysis of purine derivative (**PD**) and creatinine concentrations, and also aliquots representing 10 and 20% of daily feces and urine, respectively, were stored at -20°C for chemical analyses. On d33, approximately 20 mL of rumen content was collected from each animal before feeding, using a stomach tube attached to a vacuum pump and strained through 2 layers of cheesecloth. The pH was measured, and aliquots were taken for $\text{NH}_3\text{-N}$ and VFA analysis. Freeze-dried aliquots were used for quantification of bacterial and archaeal populations. Every day during the adaptation and sampling periods, goats were hand-milked once a day before feeding and milk yield was recorded. Every sampling day (5-d), milk density was measured and aliquots were stored at -30°C without preservatives for the analysis of fat, protein, lactose, casein, total solids and FA contents.

Capítulo 4

Table 1. Composition and price of diet ingredients.

Item	Alfalfa hay	Concentrate	FB-T ¹	FB-C	FB-B
Ingredient, g/kg DM					
Wheat shorts	-	350	-	-	-
Corn grain	-	50	-	-	-
Tomato	-	-	125	0	0
Cucumber	-	-	0	67	0
Barley	-	160	0	0	81
Sunflower meal	-	120	94	101	99
Soybean hulls	-	90	-	-	-
Corn shorts	-	100	-	-	-
Soybean meal	-	90	-	-	-
Wheat straw	-	-	581	620	611
Beet molasses	-	-	29	31	31
Fatty acid salts	-	4.5	-	-	-
Quicklime	-	22	79	85	83
NaCl	-	3.5	47	50	50
Urea	-	0	34	35	36
Vitamin-mineral mixture ²	-	25	10	11	11
Nutrient, g/kg DM					
Dry matter, g/kg fresh matter	906	927	907	933	930
OM	881	893	814	818	823
CP	212	170	165	149	152
NDF	417	338	466	483	478
ADF	251	143	273	289	294
Acid detergent lignin	59.0	25.0	44.7	40.0	41.4
Ether extract	13.9	34.1	7.29	2.68	3.91
Gross energy, MJ/kg DM	18.2	18.2	16.0	15.7	15.6
FA, % of total fat					
14:0	5.80	1.04	1.65	5.21	3.41
16:0	31.6	30.4	22.8	35.3	33.3
16:1	0.12	0.60	0.45	0.33	0.50
17:0	0.70	0.22	0.33	0.55	0.72
18:0	8.04	7.24	7.76	7.37	13.3
<i>cis</i> -9 18:1	5.26	27.7	22.4	18.9	18.9
<i>cis</i> -9 <i>cis</i> -12 18:2	15.1	29.4	39.9	24.9	25.1
20:0	1.99	0.41	0.84	1.33	1.33
18:3 n-3	29.5	2.68	3.04	6.05	3.49
22:0	1.92	0.34	0.74	0.00	0.00
Price, €/kg fresh matter	0.20	0.40	0.042	0.041	0.047

¹T, C and B, feed blocks including tomato, cucumber and barley, respectively. ²Formulated (per kilogram) with NaCl, 277 g; ashes from the two-stage dried olive cake, 270 g; (PO₄)₂H₄Ca, 250 g; MgSO₄, 200 g; CuO, 184 mg; I, 25 mg; CoO, 8.5 mg; Se, 4 mg; ZnO, 2.28 mg; and 83,500 and 16,700 IU of vitamins A and D, respectively.

From day 33 to 39 animals were split in two blocks of 4 goats, then each animal within the block was placed in individual open circuit respiration chambers during 3 days for methane emissions measurement. A battery of four chambers was used, each measuring 1.8 m wide × 1.8 m deep × 1.5 m tall and made of metal frame and polycarbonate. Chamber air temperature was maintained between 10 and 20 °C. Methane measurement interruptions occurred daily at 0900 h for diet supply, milking and chamber floor cleaning. These interruptions had little impact on the daily methane emissions as they lasted for around 10 min for each chamber and occurred when the corresponding exhaust duct was not being sampled.

Fluxes were calculated twice a day and then averaged to derive the 24-h emission value.

Real-time PCR Analysis

The abundances of total bacteria and archaea populations in samples from the rumen of goats were quantified using quantitative real time PCR (**qPCR**). Extraction and purification of DNA were performed from approximately 50 mg freeze-dried samples, using the repeated bead beating (Mini-bead Beater; BioSpec Products, Bartlesville, OK) plus column procedure of Yu and Morrison (2004). Extracted DNA yield and purity were assessed by using NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer (NanoDrop

Technologies, Wilmington, DE). The DNA samples were used as templates to quantify the copy numbers of 16S rRNA (for bacteria) and of methyl coenzyme M reductase A gene (for methanogenic archaea). For each microbial group 3 different aliquots of DNA were analyzed using qPCR as described by Wright et al. (2009) using the following primer pairs: forward: 5'-CGGCAACGAGCGCAACCC-3' and reverse: 5'-CCATTGTAGCACGTGTGTAGCC-3' for total bacteria (Denman and McSweeney, 2006), and forward: 5'-GGATTAGATACCCSGGTAGT-3' and reverse: 5'-GTTGARTCCAATTAACCGCA-3' for methanogenic archaea (Christophersen et al., 2007). The external standards used for the qPCR amplifications have been validated previously for rumen bacteria (Denman and McSweeney, 2006) and methanogenic archaea (Christophersen et al., 2007).

Chemical Analyses

Dry matter (method 934.01), ash (method 942.05), ether extract (method 920.39), and N (method 984.13) in samples of supplied and refused diet ingredients, feces, and urine were determined according to AOAC (2005). The N values of feeds, refusals, feces, and urine, determined by the Kjeldahl procedure, were converted to CP by multiplying by 6.25. The analyses of NDF and ADF were carried out according to Van Soest et al. (1991) using an Ankom220 Fiber Analyzer unit (Ankom Technology Corp., Macedon, NY) with α - amylase for NDF analysis in concentrate samples and both NDF and ADF were expressed exclusive of residual ash. Lignin was determined by solubilization of cellulose with 72% sulfuric acid. Free, protein-bound, and fiber-bound condensed tannins were sequentially extracted following the procedure described by Pérez-Maldonado and Norton (1996). Condensed tannins from quebracho powder (Roy Wilson Dickson Ltd., Mold, UK) were used as a standard. The fat content in feedstuffs and feces was measured by extraction with petroleum ether (boiling point, 40 to 60°C). The energy content of the samples was determined by using an adiabatic calorimeter (model 1356, Parr Instruments Co., Moline, IL). Rumen content samples were also analyzed for total and individual VFA by gas chromatography following the method described by Isac et al. (1994). The NH₃-N concentration was determined by a colorimetric method (Weatherburn, 1967).

Milk total solid content was determined by lyophilization of milk samples. The total N content was determined by the Kjeldahl procedure. Nonprotein-N was analyzed in samples of milk filtrates after precipitation with 12% (wt/vol) trichloroacetic acid solution. Noncasein-N was

determined in milk filtrates after precipitation with 10% (wt/vol) acetic acid at a pH of 4.1 (Recio et al., 1997). Values of N in milk were converted to the corresponding protein by multiplying by 6.38. The milk fat content was measured following the Gerber method (Pearson, 1976).

For methane measurements, air stream in each duct was subsampled, and methane concentration was measured continuously using a Gas analyser ADC MGA3000 (Spurling Works, Herts, UK).

The purine bases (**PB**) concentration in feeds and creatinine and PD in urine were determined according to Balcells et al. (1992) using an HPLC, which consisted of a multisolvent delivery system (model 510; Waters, Milford, MA), an injector (WatersTM 717 plus Autosampler, Waters), a multiwavelength detector (model 481; Lambda-Max, LC Spectrophotometer, Waters, set to 205 nm), and a double 4.0 mm × 250 mm C18 ODS-2 analytical column (Waters Spherisorb). The PB and PD were quantified by peak integration using the Waters HPLC systems software Millennium32.

Extraction of total FA in samples of feedstuffs was performed following the recommendations of Devillard et al. (2006). The FA methyl esters were prepared according to a standard procedure described previously (Wąsowska et al., 2006). For milk FA composition analysis, FA were extracted and transesterified to FA methyl esters as described by Abecia et al. (2011). Milk fat methyl esters were separated and quantified using a gas chromatograph (Model Focus GC, Thermo Scientific, Milan, Italy) equipped with a flame-ionization detector and a 100-m fused silica capillary column (0.25 mm i.d., 0.2- μ m film thickness; TR-CN100, Teknokroma, Barcelona, Spain) and helium as the carrier gas. Total FAME profile in a 1- μ L sample volume at a split ratio of 1:50 was determined using a temperature gradient program (Shingfield et al., 2003). Peaks were routinely identified based on retention time comparisons with authentic FAME standards when available (47885-U, N5252, and O5632: Sigma Aldrich, Madrid, Spain; 20-1813-9: Larodan Fine Chemicals, Malmö, Sweden) and chromatograms reported in the literature (e.g., Shingfield et al., 2003). Identification was validated based on GC-MS analysis of FAME. The mass spectrometer (ITQ 900, Thermo Scientific, Austin, TX) was operated at 225 °C in the electron impact ionization mode and mass spectra were recorded with 70 eV ionization energy using helium as the carrier gas and the same temperature gradient used for routine analysis of FAME (Shingfield et al., 2003). Although the mass spectra of FAME provides limited information concerning FA structure, comparisons with an online

Capítulo 4

reference library of electron impact ionization spectra (<http://lipidlibrary.aocs.org/ms/masspec.html>) and chromatographic retention data allowed the identification of >96% of FAME in all samples.

Calculations and Statistical Analyses

Nutrients apparent digestibilities were determined from corresponding intakes and losses in feces. Nitrogen and energy balances were obtained taking into account N and energy losses in urine, feces and milk, and energy loosed in methane (0.890 MJ/mol of methane). The amount of N and energy excreted into milk was also considered.

Milk protein-N content was calculated as the difference between total and nonprotein-N in milk. The casein-N in milk was calculated as the difference between total and noncasein-N. The whey-N in milk was calculated as the difference between milk protein and casein-N. Milk lactose was calculated as the difference between the amount of total solids and protein, fat, and total ash in milk.

Absorbed PB were calculated as daily PD urinary excretion/0.74. The 0.74 value was obtained from Mota et al. (2008) for the PB recovery rates in goats. Microbial nitrogen flow was estimated from absorbed PB and PB:N ratios in the total bacterial pellet obtained in previous experiments using rumen fistulated goats fed similar diets (M. Romero-Huelva, unpublished data). The efficiency of microbial N synthesis was expressed per kilogram of OM apparently fermented in the rumen (calculated as 0.65 of digestible OM intake; ARC, 1984), and calculated as follows: Efficiency of microbial N synthesis = Microbial nitrogen flow (mg/d) / OMAFR intake (g/d).

The flux of methane for each chamber was calculated for the last 2d of the measurement period from the chamber fresh-air intake and exhausts concentrations and means air flow (L / min).

The SPSS for Windows, version 19.0 (2010; SPSS Inc., Chicago, IL) was used for data entry and statistical analysis. Data were analyzed by the GLM using the repeated measures ANOVA by following a 4 × 4 Latin square design. Diet was considered as fixed effect, and period and animal were considered as random effects. When a significant effect of diet was found, post hoc comparison of means was made using the less significative difference (DMS) test: $\alpha_c = 1 - (1 - \alpha)^k$; where α_c is the comparison wise error rate, α the significance level, and k is the number of comparisons performed. Differences were considered significant at $P < 0.05$, and $P < 0.10$ values were declared as trends and discussed.

RESULTS AND DISCUSSION

Feed Composition

Analyses of waste fruits carried out in different seasons showed that chemical composition was very stable throughout the year (data not shown). The absence of differences may rely upon the homogeneous conditions when vegetables are produced under the controlled conditions of greenhouses. The FB had lower OM, CP, gross energy and ether extract, but higher NDF, ADF and acid detergent lignin compared with the concentrate (Table 1). Crude protein and energy contents were similar for all FB. Tomato and cucumber based FB were rich in free, fibre-bound and total condensed tannins (1.7, 15.5 and 20 g / kg DM, respectively) compared with concentrate and barley-based FB (1.2, 12.3 and 15 g / kg DM, respectively). However, protein-bound condensed tannins concentration in cucumber-based blocks and concentrate was similar (1.85 g / kg DM). Feed blocks including tomato and cucumber had higher percentage of linoleic (LA; *cis*-9, *cis*-12 18:2) and linolenic acid (LNA; *cis*-9, *cis*-12, *cis*-15 18:3), respectively, compared with the concentrate. Considering the amount of cereals included in the concentrate and the FB used in the present work, the average intakes and the current cost of diet ingredients in Spain (Table 1), a reduction of 22% in feeding cost may be achieved by using diets including FB, which is in agreement with observations from other authors (Molina-Alcaide et al., 2010). Although this substantial reduction in feeding cost, wastes transportation and FB manufacturing should be considered in each situation in order to estimate the profit margins.

Intake, Nutrient Apparent Digestibility, and Energy and N Utilization

Intake of DM (Table 2) tended to be lower ($P = 0.085$) with diets containing FB compared with the control one, which may be associated with the lower ($P = 0.043$) concentrate + FB intake observed in goats fed FB. Although there were no differences ($P = 0.84$) on alfalfa hay intake, average values were slightly higher in diets containing FB than in the control one. Fat intake was about 23% higher ($P = 0.02$) for AC than for ACT, ACC and ACB. Average daily intakes of FB were in the line of those found by Molina-Alcaide et al. (2010) for Murciano-Granadina dairy goats fed diets including FB containing olive cake and lower than those found by Ben Salem and Znaidi (2008) for lambs fed tomato and olive cake-based FB. Sansoucy (1986) also reported a wide variation of block intake/animal per day in sheep and goats.

Table 2. Intake (g/d) and apparent digestibility (g/g) of nutrients in dairy goats fed the experimental diets (n = 8).

Item	Diet ₁				SEM	P-value
	AC	ACT	ACC	ACB		
Intake						
Dry matter	1631	1548	1555	1554	37.9	0.085
Alfalfa hay	705	737	730	743	39.6	0.843
Concentrate	925 ^b	602 ^a	602 ^a	602 ^a	4.05	< 0.001
Blocks	0 ^a	208 ^b	222 ^b	209 ^b	23.4	< 0.001
OM	1439	1360	1368	1363	38.5	0.509
Fat	41.6 ^b	33.0 ^a	32.0 ^a	31.4 ^a	0.87	0.017
CP	311	300	297	300	6.96	0.701
NDF	595	587	601	599	22.2	0.985
ADF	302	313	320	317	14.7	0.914
Apparent digestibility						
Dry matter	0.69	0.68	0.67	0.69	0.009	0.530
Organic matter	0.72	0.71	0.69	0.71	0.009	0.562
Fat	0.80	0.73	0.74	0.75	0.017	0.061
CP	0.78	0.76	0.76	0.77	0.009	0.322
NDF	0.54	0.55	0.54	0.57	0.011	0.904
ADF	0.46	0.46	0.47	0.49	0.016	0.889

^{a,b} Within a row means not bearing a common superscript letter differ ($P < 0.05$). ¹ AC = 1000 g alfalfa hay and 1000 g concentrate; ACT = 1000 g alfalfa hay, 650 g concentrate, and 231.5 ± 68.8 g tomato feed block; ACC = 1000 g alfalfa hay, 650 g concentrate, and 239 ± 58.9 g cucumber feed block; ACB = 1000 g alfalfa hay, 650 g concentrate, and 223 ± 87.6 g barley feed block (fresh matter basis).

While the apparent digestibility of nutrients was unaffected ($P \geq 0.32$) by diet, the replacement of concentrate with FB tended ($P = 0.06$) to reduce the average digestibility of fat. Although, similar results were reported by Molina-Alcaide et al. (2010) for DM and OM digestibility in lactating Murciano-Granadina goats fed diets including olive cake-based FB, Ben Salem and Znaidi (2008) reported decreased DM and OM digestibility when the concentrate was partially replaced with olive cake or tomato-based FB in Barbarine lambs fed diets based on cereal straw. These differences may rely upon factors such as animal species, physiological state and FB and diet formulation. Moreover, in the present work, the partial replacement of the concentrate with FB did not reduce NDF or ADF apparent digestibility. As increased levels of concentrate in ruminant diets are often associated to higher DM and OM and lower NDF digestibilities, the use of tomato and cucumber-based FB seems to be a successful strategy to partially replace the concentrate in goat's diet.

The N intake per kilogram of metabolic weight (Table 3) was similar ($P = 0.38$) for AC and those diets including FB. While fecal N was similar ($P = 0.92$) among diets, urine N was higher ($P = 0.04$) for animals receiving diet AC than for those fed diets including FB. The percentage of milk protein N in relation to the N balance was lower ($P = 0.04$) for

animals fed diets including tomato-based FB than for those fed the other diets, in agreement with Bequette et al. (1999), who stated that the amino acid profile of different protein sources may have an influence on body retention and milk yield of N. Overall, the inclusion of tomato and cucumber wastes in FB did not compromise N intake or utilization, promoting lower N excretion in urine compared with animals fed the control diet, which has important environmental implications (Vasta et al., 2008).

The energy intake was higher ($P = 0.03$) for AC than for ACT, ACC and ACB. Fecal energy was similar ($P = 0.52$) among diets whereas urine energy was higher ($P = 0.01$) for AC than for those including FB. Digestible energy and energy in methane were higher ($P < 0.05$) for AC than for FB containing diets. Our results are in agreement with previous observations made by Cerrillo et al. (1999) who noted a reduction in digestible energy when feeding goats with decreasing amounts of concentrate. The percentage of ME in relation to the digestible energy was affected ($P = 0.047$) by diet, the lowest value being for the control diet. Therefore, the lower values on energy digestibility found in goats supplemented with FB were compensated with lower methane and urine energy losses (Table 3), and thus resulting in similar values of ME ($P = 0.57$).

Capítulo 4

Table 3. Mean values for body weight, nitrogen and energy utilization in dairy goats fed the experimental diets (n = 8).

Item	Diet ¹				SEM	P-value
	AC	ACT	ACC	ACB		
Body weight (BW), kg	38.6	38.7	40.3	40.2	1.79	0.411
BW ^{0.75}	15.5	15.5	16.0	15.9	0.54	0.402
g/kg of BW ^{0.75}						
N intake	3.25	3.12	3.01	3.10	0.13	0.384
Fecal N	0.730	0.760	0.737	0.704	0.066	0.922
Urine N	1.51 ^b	1.31 ^a	1.32 ^a	1.40 ^{ab}	0.064	0.037
Milk total N	0.398	0.346	0.386	0.373	0.036	0.728
Milk protein N	0.361	0.321	0.352	0.341	0.034	0.568
Digestible N ²	2.52	2.36	2.28	2.40	0.073	0.077
N balance ³	1.01	1.05	0.954	0.997	0.054	0.961
Retained N ⁴	0.609	0.701	0.568	0.624	0.042	0.472
N utilization, %						
Digestible N/intake N	77.9	75.8	75.5	77.5	0.92	0.322
N balance/digestible N	39.7	43.9	41.1	41.4	1.92	0.740
Milk protein N/digestible N	14.3	13.7	15.3	14.2	0.77	0.073
Milk protein N/N balance	37.4 ^b	31.9 ^a	38.0 ^b	35.7 ^b	1.43	0.043
Milk protein N/milk total N	91.0	92.5	91.2	91.3	0.70	0.754
Milk protein N/intake N	11.1	10.3	11.5	11.0	0.97	0.759
MJ/kg of BW ^{0.75}						
Energy intake	1.93 ^b	1.80 ^a	1.77 ^a	1.79 ^a	0.060	0.029
Fecal energy	0.567	0.569	0.543	0.532	0.038	0.517
Urine energy	0.080 ^b	0.070 ^a	0.074 ^a	0.075 ^a	0.004	0.008
Milk energy	0.251	0.229	0.243	0.233	0.019	0.970
Digestible energy ⁵	1.37 ^b	1.23 ^a	1.23 ^a	1.25 ^a	0.040	0.026
Methane energy ⁶	0.110 ^b	0.072 ^a	0.067 ^a	0.080 ^a	0.004	<0.001
ME ⁷	1.18	1.09	1.09	1.10	0.033	0.575
Energy utilization, %						
Digestible energy/energy intake	70.7	68.7	69.2	70.3	0.81	0.085
Milk energy/digestible energy	18.7	18.4	20.3	18.6	1.47	0.818
Milk energy/ME	21.9	20.8	23.1	21.3	1.70	0.855
ME/energy intake	60.8	60.7	61.2	61.6	0.87	0.937
ME/digestible energy	85.9 ^a	88.4 ^b	88.3 ^b	87.5 ^{ab}	0.28	0.047

^{ab} Within a row means not bearing a common superscript letter differ ($P < 0.05$). ¹ AC = 1000 g alfalfa hay and 1000 g concentrate; ACT = 1000 g alfalfa hay, 650 g concentrate, and 231.5 ± 68.8 g tomato feed block; ACC = 1000 g alfalfa hay, 650 g concentrate, and 239 ± 58.9 g cucumber feed block; ACC = 1000 g alfalfa hay, 650 g concentrate, and 223 ± 87.6 g barley feed block (fresh matter basis). ² Digestible N = intake N – fecal N. ³ N balance = digestible N – urine N. ⁴ Retained N = N balance – milk total N. ⁵ Digestible energy = energy intake – fecal energy. ⁶ Methane energy = 0.890 MJ/mol of CH₄ (Newbold et al. 2007). ⁷ ME = digestible energy – urine energy – methane energy.

Microbial Nitrogen Flow

Creatinine excretion varied from 183 to 200 µmol/kg BW^{0.75}. The urinary excretion (Table 4) of total purine derivatives were similar ($P = 0.72$) among treatments, values being lower than those obtained by Mota et al. (2008) in Murciano-Granadina goats fed alfalfa plus concentrate (745 µmol PD/kg BW^{0.75}). The lowest ($P < 0.05$) microbial nitrogen flow and efficiency were found in goats fed ACT, then in goats fed AC and ACB and the highest value corresponding to goats fed ACC. Low availability of protein and nutritive value have been reported for tomato by Ventura et al. (2009).

Although microbial N flow relies upon the synchronized supply of nitrogen and energy to microorganisms (Bach et al., 2005), which was improved with diets including FB, other factors such as energy and nitrogen quality in the three types of FB could influence digestibility, N and energy utilization.

Milk Yield and Composition

Neither milk yield nor its component concentrations (Table 4) were affected by the partial replacement of concentrate with FB in diets of dairy goats. Only differences on the yield and composition

of lactose were found ($P < 0.05$), with higher values with ACB, followed by AC and ACC, and finally ACT. In contrast to our results, Molina-Alcaide et al. (2010) found lower values on milk production in goats fed FB containing olive cake, but without any

differences in milk composition. On the other hand, the efficiency of feed utilization was similar among diets, showing the potential of FB to successfully replace cereal-based concentrates in ruminant diets.

Table 4. Effect of diet on milk production and composition, feed efficiency, urinary excretion of purine derivatives, microbial N flow, and efficiency in dairy goats fed the experimental diets (n = 8)

Item	Diet ¹				SEM	P-value
	AC	ACT	ACC	ACB		
Milk yield, g/d						
Milk	1019	944	1041	1000	83.8	0.826
Protein	35.5	31.8	35.5	33.9	3.33	0.781
Casein	29.9	26.7	30.4	29.2	2.77	0.740
Whey protein	5.60	5.09	5.10	5.01	0.563	0.918
Fat	57.6	52.3	52.8	52.2	5.31	0.801
Lactose	52.3 ^b	42.8 ^a	56.1 ^b	59.0 ^c	3.15	0.029
Total solid	151	132	150	150	10.6	0.669
Gross energy, MJ/d	3.88	3.55	3.84	3.63	0.339	0.816
Milk composition, g/kg						
Protein	34.7	33.9	33.9	33.9	1.68	0.935
Casein	29.3	28.4	29.1	29.1	1.47	0.921
Whey protein	5.42	5.58	4.80	4.88	0.284	0.686
Fat	55.1	55.7	50.8	54.4	2.00	0.067
Lactose	52.6 ^b	46.0 ^a	55.2 ^b	59.5 ^c	2.55	0.037
Total solid	148	141	145	153	4.94	0.069
Gross energy, MJ/kg	3.76	3.77	3.67	3.72	0.149	0.744
Feed Efficiency ² , %	13.0	12.6	13.7	13.0	0.010	0.89
Total purine derivatives in urine, $\mu\text{mol}/\text{kg}^{0.75}$	638	563	615	588	44.3	0.72
Microbial N flow, g/d	16.2 ^b	13.1 ^a	18.9 ^c	15.4 ^b	1.00	0.047
EMNS ³ , g/kg of OMAFR	24.2 ^b	21.1 ^a	30.8 ^c	24.9 ^b	1.03	0.04

^{a,b,c} Within a row means not bearing a common superscript letter differ ($P < 0.05$). ¹ AC = 1000 g alfalfa hay and 1000 g concentrate; ACT = 1000 g alfalfa hay, 650 g concentrate, and 231.5 ± 68.8 g tomato feed block; ACC = 1000 g alfalfa hay, 650 g concentrate, and 239 ± 58.9 g cucumber feed block; ACC = 1000 g alfalfa hay, 650 g concentrate, and 223 ± 87.6 g barley feed block (fresh matter basis). ²Efficiency of feed utilization; FE = (Milk energy / energy intake) × 100. ³EMNS: Efficiency of microbial N synthesis; OMAFR = OM apparently fermented in the rumen (65% of digestible OM intake; ARC, 1984).

Some research has been conducted on changes in milk FA composition in small ruminants when feeding agroindustrial by-products, such as olive cake (Molina-Alcaide et al., 2010), olive leaves (Tsiplakou and Zervas, 2008), pomegranate seed pulp (Modaresi et al., 2011) and tomato pomace (Romano et al., 2010). The most abundant individual FA in milk found in the present work were palmitic, oleic, capric, myristic, stearic, and lauric acids, in line of those previously reported by Sanz Sampelayo et al. (2000) in Murciano-Granadina dairy goats. Milk from goats fed diets including FB had (Table 5) higher ($P < 0.05$) myristoleic (*cis*-9 14:1), palmitoleic (*cis*-9 16:1), 17:0, *anteiso* 17:0, LA, LNA and total PUFA concentrations than those fed AC; a decrease ($P = 0.04$) of about 12% on the concentration of stearic acid was observed in ACT and ACB. Additionally, the concentrate replacement with FB tended to decrease ($P = 0.10$) the $\Sigma n6/\Sigma n3$ ratio in goats milk, which appears to be of great importance for human health (Simopoulos, 2002).

Milk fat of goats fed ACT increased ($P = 0.04$) *cis*-9, *trans*-11 CLA content, and ACB tended ($P = 0.06$) to decrease *trans*-11 18:1 content. The higher ($P < 0.05$) accumulation of *cis*-9, *trans*-12 18:2 and *trans*-11, *cis*-15 18:2, both intermediates of the LNA biohydrogenation, in milk from goats fed ACT suggests an incomplete biohydrogenation of LNA. Additionally, it could be speculated that tomato seeds were partially crushed during the manufacture of blocks, making a fraction of its FA accessible to biohydrogenating bacteria, leading to accumulation of biohydrogenation intermediates, whereas another FA fraction could remain protected, making higher amounts of PUFA available in the small intestine for absorption. Similar results were obtained by Abbeddou et al. (2011) and Romano et al. (2010), who reported increased accumulations of CLA (43.3 and 19.8%, respectively) and total PUFA (5.17 and 6.43%, respectively) in the milk of sheep supplemented with tomato by-products compared with the control diet.

Capítulo 4

Table 5. Fatty acid composition (g/100 g of identified fatty acids) of dairy goats milk fat fed the experimental diets (n = 8)

Item	Diet ¹				SEM	P-value
	AC	ACT	ACC	ACB		
SFA						
4:0	1.54	1.39	1.48	1.44	0.041	0.741
6:0	2.41	2.32	2.29	2.30	0.081	0.644
8:0	3.06	2.98	2.48	2.98	0.086	0.309
10:0	11.7	11.7	11.5	11.8	0.283	0.844
11:0	0.11	0.12	0.11	0.11	0.015	0.856
12:0	6.01	6.45	6.33	6.39	0.350	0.441
14:0	10.9	11.1	11.3	11.3	0.179	0.629
15:0	0.80	0.86	0.90	0.90	0.044	0.069
15:0 <i>iso</i>	0.19	0.21	0.23	0.21	0.017	0.072
15:0 <i>anteiso</i>	0.27	0.29	0.30	0.30	0.018	0.147
16:0	29.6	28.6	29.0	29.3	0.585	0.732
17:0	0.51 ^a	0.57 ^b	0.59 ^b	0.57 ^b	0.017	< 0.001
17:0 <i>anteiso</i>	0.34 ^a	0.38 ^b	0.37 ^b	0.38 ^b	0.016	0.039
18:0	6.93 ^b	6.15 ^a	6.24 ^{ab}	6.00 ^a	0.378	0.043
20:0	0.19	0.18	0.19	0.18	0.010	0.507
21:0	0.058	0.069	0.069	0.077	0.003	0.261
22:0	0.053	0.049	0.064	0.067	0.004	0.072
Total SFA	74.7	73.4	73.4	74.4	0.458	0.578
MUFA						
<i>cis</i> -9 14:1	0.20 ^a	0.24 ^b	0.24 ^b	0.23 ^b	0.014	0.042
<i>cis</i> -9 16:1	0.74 ^a	0.80 ^b	0.82 ^b	0.82 ^b	0.019	0.015
² <i>trans</i> -9 16:1	0.62	0.64	0.65	0.62	0.021	0.566
³ <i>cis</i> -9 18:1	15.9	16.1	16.4	15.7	0.550	0.837
<i>cis</i> -11 18:1	0.30	0.35	0.33	0.34	0.010	0.629
<i>cis</i> -12 18:1	0.20	0.25	0.22	0.23	0.010	0.074
<i>cis</i> -13 18:1	0.042	0.047	0.043	0.045	0.003	0.567
<i>cis</i> -16 18:1	0.045	0.044	0.038	0.044	0.003	0.690
<i>trans</i> -5 18:1	0.020	0.021	0.016	0.018	0.001	0.560
<i>trans</i> -6–8 18:1	0.20 ^a	0.24 ^b	0.20 ^a	0.21 ^a	0.012	0.048
<i>trans</i> -9 18:1	0.22 ^a	0.26 ^b	0.22 ^a	0.22 ^a	0.014	0.029
<i>trans</i> -10 18:1	0.33	0.43	0.34	0.36	0.047	0.299
<i>trans</i> -11 18:1	0.82	0.89	0.78	0.68	0.060	0.061
<i>cis</i> -11 20:1	0.071	0.075	0.076	0.071	0.004	0.697
Total MUFA	19.7	20.3	20.4	19.6	0.498	0.762
PUFA						
<i>cis</i> -9, <i>cis</i> -12 18:2	1.94 ^a	2.17 ^b	2.21 ^b	2.11 ^{ab}	0.094	0.048
<i>cis</i> -9, <i>trans</i> -12 18:2	0.054 ^b	0.049 ^b	0.046 ^{ab}	0.042 ^a	0.002	0.013
<i>cis</i> -9, <i>trans</i> -11 CLA	0.57 ^{ab}	0.62 ^b	0.55 ^{ab}	0.50 ^a	0.048	0.043
<i>trans</i> -8, <i>cis</i> -13 18:2	0.090	0.093	0.084	0.090	0.004	0.068
<i>trans</i> -9, <i>cis</i> -12 18:2	0.030	0.036	0.033	0.035	0.002	0.378
<i>trans</i> -11, <i>cis</i> -15 18:2	0.037 ^a	0.053 ^b	0.048 ^{ab}	0.047 ^{ab}	0.005	0.021
<i>cis</i> -6, <i>cis</i> -9, <i>cis</i> -12 18:3	0.017	0.025	0.023	0.028	0.002	0.390
<i>cis</i> -9, <i>cis</i> -12, <i>cis</i> -15 18:3	0.39 ^a	0.54 ^b	0.52 ^b	0.54 ^b	0.036	0.037
20:3 n-6	0.020	0.027	0.023	0.038	0.004	0.099
20:4 n-6	0.20	0.23	0.26	0.22	0.011	0.076
Total PUFA	3.34 ^a	3.83 ^b	3.80 ^b	3.65 ^b	0.108	0.034
According to origin ⁴						
< 16 carbon FA	37.2	37.6	37.1	38.0	0.596	0.790
16 carbon FA	30.9	30.0	30.5	30.8	0.593	0.772
> 16 carbon FA	29.6	29.9	30.0	28.8	0.870	0.792
Σn6/Σn3	5.55	4.54	4.76	4.34	0.009	0.098

^{a,b} Within a row means not bearing a common superscript letter differ ($P < 0.05$). ¹ AC = 1000 g alfalfa hay and 1000 g concentrate; ACT = 1000 g alfalfa hay, 650 g concentrate, and 231.5 ± 68.8 g tomato feed block; ACC = 1000 g alfalfa hay, 650 g concentrate, and 239 ± 58.9 g cucumber feed block; ACB = 1000 g alfalfa hay, 650 g concentrate, and 223 ± 87.6 g barley feed block (fresh matter basis). ² Contains iso C17:0. ³ Contains *trans*-12, *cis*-10+*trans*-15 C18:1 as minor components. ⁴ < 16 carbon FA represent de novo synthesized FA, > 16 carbon FA represent preformed FA taken up from circulation, and 16 carbon FA are derived from both sources.

In addition to FA supply, other factors such as energy supply, proportion of fiber or concentrate and the presence of plant secondary compounds should be considered when the effects of dietary treatments on milk FA profile are

assessed (Leiber et al., 2005). Therefore, the higher accumulation of LNA in the milk of goats receiving FB could be associated with changes in the ruminal ecosystem due to energy shortage or specific secondary plant

metabolites presence in the diet (Leiber et al., 2005). Moreover, the improved synchronization of nutrients supply allowed when using FB in ruminants feeding (Ben Salem and Nefzaoui, 2003) might be responsible of better FA absorption in the small intestine.

Dietary intakes (mg/d) of LNA, LA, oleic (OA; *cis*-9 18:1) and stearic (data not shown) acids showed that goats feeding the diet including FB consumed less unsaturated and saturated FA (27 and 24%, respectively) than those under the control diet ($P \leq 0.034$). However, the recovery rates (g of FA excreted in milk/g of FA intake; data not shown) for LNA, LA and OA were higher (27, 28 and 25%, respectively; $P \leq 0.02$) in animals fed FB diets compared with the control diet in agreement with Abbeddou et al. (2011).

Because LA, LNA and CLA, are considered healthy for consumers due to their beneficial effects in the prevention of cardiovascular diseases and hypertension in humans (Kromhout et al., 2010), the inclusion of tomato and cucumber wastes in the form of FB in goats feeding could be an option to improve the nutritional quality of goats dairy products.

Ruminal Fermentation and Methane Production

The average pH in the rumen of goats was not different ($P = 0.39$) among diets (Table 6). Although pH was not

affected by diet, VFA concentration in the rumen of goats fed AC or ACC was higher ($P < 0.001$) than that in goats fed ACT and ACB. The lack of correlation between pH values and VFA concentration agrees with observations of other authors (Busquet et al., 2005; Cantalapiedra et al., 2009) and may be due to the contamination of rumen samples with saliva. Total VFA concentration in the rumen of goats was higher than values previously reported for Murciano-Granadina goats fed diets based on alfalfa hay (Molina-Alcaide et al., 2000). Additionally, goats supplemented with barley-based FB had lower rumen VFA concentration than the other diets. The molar proportion of acetate was higher ($P = 0.03$) for AC compared with ACT, ACC and ACB, but the acetate:propionate ratio was unaffected among diets. Isobutyrate and isovalerate molar proportions were reduced ($P = 0.005$ and 0.001 , respectively) in goats fed with AC and ACC. Goats fed diets including FB containing tomato and cucumber had lower ruminal concentration of $\text{NH}_3\text{-N}$ ($P = 0.003$) than animals receiving AC and ACB. Our ruminal $\text{NH}_3\text{-N}$ values were within the range of those found in previous studies with goats fed similar diets (Molina-Alcaide et al., 2000).

Table 6. Methane emissions, average values for pH, $\text{NH}_3\text{-N}$, total and individual VFA, microbial densities in the rumen, urinary excretion of purine derivatives, microbial N flow, and efficiency in dairy goats fed the experimental diets (n = 8).

Item	Diet ¹				SEM	P-value
	AC	ACT	ACC	ACB		
Methane emissions						
CH ₄ L/d	42.4 ^c	27.8 ^a	26.9 ^a	32.0 ^b	0.732	< 0.001
CH ₄ L/kg BW	2.77 ^c	1.81 ^a	1.71 ^a	2.03 ^b	0.095	< 0.001
CH ₄ L/kg DMI	28.2 ^c	17.4 ^a	17.2 ^a	19.7 ^b	0.558	< 0.001
pH	6.94	7.00	6.93	6.91	0.036	0.391
$\text{NH}_3\text{-N}$, mg/100 mL	28.1 ^b	18.2 ^a	18.5 ^a	25.3 ^b	0.497	0.003
Total VFA, mmol/L	149 ^c	109 ^b	161 ^c	85.6 ^a	2.62	< 0.001
mmol/100 mmol						
Acetate	67.6 ^b	65.2 ^a	65.9 ^a	65.5 ^a	0.440	0.033
Propionate	12.8	13.3	15.2	12.5	0.297	0.087
Isobutyrate	2.19 ^a	3.04 ^b	2.23 ^a	3.32 ^b	0.168	0.005
Butyrate	13.9	14.2	13.0	13.8	0.276	0.495
Isovalerate	2.43 ^a	3.04 ^b	2.71 ^a	3.61 ^b	0.125	0.001
Valerate	1.07	1.22	0.94	1.26	0.034	0.070
Acetate:propionate	5.35	5.01	4.48	5.44	0.152	0.269
Microbial densities, log gen copies/g wet weight						
Bacteria	11.5	11.4	11.5	11.4	0.092	0.423
Methanogens	9.04	8.83	8.91	8.86	0.095	0.441

^{a,b,c} Within a row means not bearing a common superscript letter differ ($P < 0.05$). ¹ AC = 1000 g alfalfa hay and 1000 g concentrate; ACT = 1000 g alfalfa hay, 650 g concentrate, and 231.5 ± 68.8 g tomato feed block; ACC = 1000 g alfalfa hay, 650 g concentrate, and 239 ± 58.9 g cucumber feed block; ACC = 1000 g alfalfa hay, 650 g concentrate, and 223 ± 87.6 g barley feed block (fresh matter basis).

Capítulo 4

There is an increasing interest in the study of antimethanogenics compounds in order to reduce livestock greenhouse gases emissions and improve the efficiency of energy utilization in ruminants. On the other hand, some dietary manipulations result in methane reduction by decreasing fermentation of OM in the rumen and shifting the site of digestion from the rumen to the intestines, diverting hydrogen away from CH₄ production during ruminal fermentation, inhibiting methanogenesis by ruminal bacteria or optimizing rumen fermentation and thereby decreasing methane emission per unit of OM digested (Ben Salem, 2010; Martín et al., 2010). There is no information regarding the effect of vegetal by-products and wastes-based FB on methane emissions. In our experiment the inclusion of FB in goat diets had an antimethanogenic effect. Thus, compared with the control diet, methane emissions expressed per kilogram of BW or DMI were lowered by about 39% with diets including tomato and cucumber FB and 29% ($P < 0.001$) in animals receiving ACB. While, the reduction on methane emissions found in goats fed with ACC, was accompanied by increased ($P = 0.09$) propionate molar proportions, the utilization of tomato and barley FB did not promote any changes on propionate. However, a reduction in methane emissions without increased propionate molar proportion could be possible when other metabolic pathways act as hydrogen sinks. Differences found among ACT, ACC and ACB regarding methane emissions are difficult to explain, and may rely upon differences in blocks chemical composition. Therefore, FB including tomato or cucumber waste fruits may also have an added value derived from the presence of plant secondary compounds which could act as natural safe antimethanogenic additives, alternative to the chemical ones as suggested by Patra and Saxena (2010). Similar values for methane emissions (L / kg DMI) using respiration chambers were also found in goats treated with bromochloromethane with proved antimethanogenic activity (Abecia et al., 2011). An additional advantage of the strategy involving the replacement of 35% of concentrate with FB including tomato or cucumber fruits, rely to the lack of effect on DMI that has been shown to decreased with some antimethanogenic strategies (Beauchemin et al., 2008). In addition, the abundances of total bacteria and methanogens were not affected by diet, suggesting the absence of any relationship between the reduction in methane emissions and abundances of methanogens (Machmüller et al., 2003). It has been hypothesized that rather than the numbers is the species composition of archaea community what drives the synthesis of methane in the rumen (Morgavi et al., 2010) but it still remains unknown which genera or species of archaea are more involved in ruminal methane production.

Thus, the reduction on methane emissions without changes on nutrients digestibility with small modifications

in rumen fermentation patterns promoted by partial replacement of concentrate with tomato and cucumber FB, suggest that tomato and cucumber FB could be a successful alternative to more expensive feed resources and to additives aiming to decrease methane emissions. In addition, the use of tomato and cucumber in dairy goats can also contribute to minimizing the negative environmental impact associated with those wastes, and animal production.

CONCLUSION

The replacement of 35% of cereals-based concentrate in lactating goats with FB containing wastes fruits of tomato and cucumber reduced animal feeding cost and methane emissions and improved the quality of FA profile in milk. Ruminal fermentation, nutrient digestibility and milk yield were not compromised by replacement of concentrate with FB.

ACKNOWLEDGEMENTS

Funding was provided by the Junta de Andalucía Excellence Projects Programme (Projects P05-AGR-0408 and P07-RNM-02746). M. Romero and E. Ramos gratefully acknowledge the receipt of a JAE-pre scholarship and JAE-post contract from the CSIC of Spain, respectively. Thanks to J. Fernandez and T. Garcia for technical assistance. Thanks to the Wastes Treatment Factory in Motril (Granada, Spain) for providing us with tomato and cucumber fruits wastes.

REFERENCES

- Abbeddou, S., B. Rischkowsky, E.K. Richter, H.D. Hess, and M. Kreuzer. 2011. Modification of milk fatty acid composition by feeding forages and agro-industrial byproducts from dry areas to Awassi sheep. *J. Dairy Sci.* 94: 4657-4668.
- Abecia, L., P. G. Toral, A. I. Martín-García, G. Martínez, N. W. Tomkins, E. Molina-Alcaide, C. J. Newbold, and D. R. Yáñez-Ruiz. 2011. Effect of bromochloromethane on methane emission, rumen fermentation pattern, milk yield, and fatty acid profile in lactating dairy goats. *J. Dairy Sci.* 95:2027-2036.
- Aguilera, J. F., C. Prieto, and J. Fonolla. 1990. Protein and energy metabolism of lactating Granadina goats. *Br. J. Nutr.* 63:165-175.
- AOAC. 2005. Official Methods of Analysis. 18th ed. Association of Official Analytical Chemists International, Gaithersburg, MD, USA.
- ARC. 1984. The Nutrient Requirement of Ruminant Livestock (No.1). Commonwealth Agriculture Bureaux, Slough, UK.
- Bach, A., S. Calsamiglia, and M. D. Stern. 2005. Nitrogen metabolism in the rumen. *J. Dairy Sci.* 88: 9-21.

- Balcells, J., and J. Guada. 1992. Simultaneous determination of allantoin and oxypurines in biological fluids by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.* 575: 153-157.
- Beauchemin, K. A., M. Kreuzer, F. O'mara, and T. A. McAllister. 2008. Nutritional management for enteric methane abatement: a review. *Aust. J. Exp. Agr.* 48: 21-27.
- Ben Salem, H., and A. Nefzaoui. 2003. Feed blocks as alternative supplements for sheep and goats. *Small Ruminant Res.* 49: 275-288.
- Ben Salem, H., and I. A. Znaidi. 2008. Partial replacement of concentrate with tomato pulp and olive cake-based feed blocks as supplements for lambs fed wheat straw. *Anim. Feed Sci. Tech.* 147: 206-222.
- Ben Salem, H. 2010. Nutritional management to improve sheep and goat performances in semiarid regions. *Rev. Bras. Zootecn.* 39: 337-347.
- Bequette, B. J., F. R. C. Backwell, C. E. Kyle, A. G. Calder, V. Buchan, L. A. Crompton, J. France, and J. C. MacRae. 1999. Vascular sources of phenylalanine, tyrosine, lysine, and methionine for casein synthesis in lactating goats. *J. Dairy Sci.* 82:362-377.
- Busquet, M., S. Calsamiglia, A. Ferret, P.W. Cardozo, and C. Kamel. 2005. Effects of cinnamaldehyde and garlic oil on rumen microbial fermentation in a dual flow continuous culture. *J. Dairy Sci.* 88: 2508-2516.
- Cantalapiedra-Hijar, G., D.R. Yáñez-Ruiz, A.I. Martín-García, and E. Molina-Alcaide. 2009. Effects of forage:concentrate ratio and forage type on apparent digestibility, ruminal fermentation, and microbial growth in goats. *J. Anim. Sci.* 87: 622-631.
- Cerrillo, M. A., J. R. Russell, and M. H. Crump. 1999. The effects of hay maturity and forage to concentrate ratio on digestion kinetics in goats. *Small Rum. Res.* 32: 51-60.
- Christophersen, C. T. 2007. Ph.D. thesis. University of Western Australia, Perth.
- Denman, S. E., and C. S. McSweeney. 2006. Development of a real-time PCR assay for monitoring anaerobic fungal and cellulolytic bacterial populations within the rumen. *FEMS Microbiol. Ecol.* 58: 572-582.
- Devillard, E., F.M. McIntosh, C.J. Newbold, and R.J. Wallace. 2006. Rumen ciliate protozoa contain high concentrations of conjugated linoleic acids and vaccenic acid, yet do not hydrogenate linoleic acid or desaturate stearic acid. *Br. J. Nutr.* 96: 697-704.
- FAO. 2011. *Crop Prospects and Food Situation*, No. 4, December 2011. <http://www.fao.org/giews/english/cpfs/index.htm>.
- Isac, M. D., M. A. García, J. F. Aguilera, and E. Molina-Alcaide. 1994. A comparative study of nutrient digestibility, kinetics of digestion and passage and rumen fermentation pattern in goats and sheep offered medium quality forages at the maintenance level of feeding. *Arch. Tierernahr.* 46: 37-50.
- Kromhout, D., E. J. Giltay, and J. M. Geleijnse. 2010. n-3 fatty acids and cardiovascular events after myocardial infarction. *N. Engl. J. Med.* 363:2015-2026.
- Leiber, F., M. Kreuzer, D. Nigg, H. R. Wettstein, and M. R. Scheeder. 2005. A study on the causes for the elevated n- 3 fatty acids in cows' milk of alpine origin. *Lipids.* 40: 191-202.
- Machmüller, A., C.R. Soliva, and M. Kreuzer. 2003. Methane suppressing effect of myristic acid in sheep as affected by dietary calcium and forage proportion. *Br. J. Nutr.* 90: 529-540.
- Martín, C., D.P. Morgavi, and M. Doreau. 2010. Methane mitigation in ruminants: from microbe to the farm scale. *Animal.* 4: 351-365.
- Modaresi, J., M.H. Fathi Nasri, L. Rashidi, O. Dayani, and E. Kebreab. 2011. Short communication: Effects of supplementation with pomegranate seed pulp on concentrations of conjugated linoleic acid and punicic acid in goat milk. *J. Dairy Sci.* 94: 4075-4080.
- Molina-Alcaide, E., A. I. García Martín, and J. F. Aguilera. 2000. A comparative study of nutrient digestibility, kinetics of degradation and passage and rumen fermentation pattern in goats and sheep offered good quality diets. *Livest. Prod. Sci.* 64: 215-223.
- Molina-Alcaide, E., E. Y. Morales-García, A. I. Martín-García, H. Ben Salem, A. Nefzaoui, and M. R. Sanz-Sampelayo. 2010. Effects of partial replacement of concentrate with feed blocks on nutrient utilization, microbial N flow, and milk yield and composition in goats. *J. Dairy Sci.* 93: 2076-2087.
- Morgavi, D. P., E. Forano, C. Martin, and C. J. Newbold. 2010. Microbial ecosystem and methanogenesis in ruminants. *Animal.* 4: 1024-1036.
- Mota, M., J. Balcells, N. Ozdemir Baber, S. Bölüktepe and A. Belenguer. 2008. Modelling purine derivative excretion in dairy goats: endogenous excretion and the relationship between duodenal input and urinary output. *Animal.* 2: 44-51.
- Patra, A. K., and J. Saxena. 2010. A new perspective on the use of plant secondary metabolites to inhibit methanogenesis in the rumen. *Phytochemistry.* 71:1198-1222.
- Pearson, D.M. 1976. *Laboratory Techniques in Food Analysis*. Butterworths, London, UK.
- Perez-Maldonado, R. A., and B.W. Norton. 1996. Digestion of 14C-labelled condensed tannins from *Desmodium intortum* in sheep and goats. *Br. J. Nutr.* 76:501-513.

Capítulo 4

- Recio, I., M. L. Pérez-Rodríguez, L. Amigo, and M. Ramos. 1997. Study of the polymorphism of caprine milk caseins by capillary electrophoresis. *J. Dairy Res.* 64:515–523.
- Romano, R., F. Masucci, A. Giordano, S. S. Musso, D. Naviglio, and A. Santini. 2010. Effect of tomato by-products in the diet of Comisana sheep on composition and conjugated linoleic acid content of milk fat. *Int. Dairy J.* 20:858–862.
- Sansoucy, R., 1986. The Sahel: manufacture and molasses–urea blocks. *World Anim. Rev.* 57: 40–48.
- Sanz Sampelayo, M.R., J.J. Martín Alonso, D. Morón, L. Pérez, and J. Boza. 2000. Production of healthier goat milk. Use of a concentrate supplemented with a “protected” fat rich in PUFA. *J. Physiol. Biochem.* 56: 231-236.
- Shingfield, K. J., S. Ahvenjärvi, V. Toivonen, A. Äröla, K. V. V. Nur-mela, P. Huhtanen, and J. M. Griinari. 2003. Effect of dietary fish oil on biohydrogenation of fatty acids and milk fatty acid content in cows. *Anim. Sci.* 77:165–179.
- Simopoulos, A. P. 2002. The importance of the ratio of omega-6/omega-3 essential fatty acids. *Biomed. Pharmacother.* 56:365-379.
- Tsiplakou, E., and G. Zervas. 2008. Comparative study between sheep and goats on rumenic acid and vaccenic acid in milk fat under the same dietary treatments. *Livest. Sci.* 119:87-94.
- Van Soest, P. J., J. B. Robertson, and B. A. Lewis. 1991. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *J. Dairy Sci.* 74: 3583–3597.
- Vasta, V., A. Nudda, A. Cannas, M. Lanza, and A. Priolo. 2008. Alternative feed resources and their effects on the quality of meat and milk from small ruminants. *Anim. Feed Sci. Tech.* 147: 223-246.
- Ventura, M. R., M. C. Pieltain, and J. I. R. Castanon. 2009. Evaluation of tomato crop by-products as feed for goats. *Anim. Feed Sci. Tech.* 154: 271-275.
- Wąsowska, I., M. Maia, K.M. Niedźwiedzka, M. Czauderna, J.M.C. Ramalho Ribeiro, E. Devillard, K.J. Shingfield, and R.J. Wallace. 2006. Influence of fish oil on ruminal biohydrogenation of C18 unsaturated fatty acids. *Br. J. Nutr.* 95: 1199–1211.
- Weatherburn, M. W. 1967. Phenol-hypochlorite reaction for determination of ammonia. *Anal. Chem.* 39: 971-974.
- Wright, A.D.G., K.S. Northwood, and N.E. Obispo. 2009. Rumen-like methanogens identified from the crop of the folivorous South American bird, the hoatzin (*Opisthocomus hoazin*). *ISME J.* 3: 1120–1126.
- Yu, Z., and M. Morrison. 2004. Improved extraction of PCR-quality community DNA from digesta and fecal samples. *BioTechniques.* 36: 808-812.

Publicación 4

**Effect of partial replacement of concentrate with feed blocks including
tomato wastes from greenhouse horticulture on methane and milk
production and milk composition in goats**

Romero-Huelva M., E. Ramos-Morales and E. Molina-Alcaide

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

**(En prensa en *Options Méditerranéennes. Feeding and management strategies to
improve livestock productivity, welfare and product quality under climate change*)**

Capítulo 4

Abstract. The aim of the present work was to study, in dairy goats, the effect of replacing 35% of concentrate in the diet with feed blocks including tomato fruits wastes on CH₄ emission, milk yield and fatty acid and amino acid profiles. Eight Granadina goats (39.6 ± 1.89 kg BW) in the middle of the third lactation were used, and a two-periods trial was carried out following a crossover design. In each period, 4 animals randomly received 1.0 kg of alfalfa hay (AH) plus 1 kg of concentrate (diet AC) and the other 4 received 1.0 kg AH plus 0.65 kg of concentrate plus tomato feed blocks ad libitum (diet ACB). The amounts of AH and concentrate supplied to the animals fed diet AC were sufficient to allow daily milk production of up to 2 kg per goat (Aguilera et al., 1990) The feed block was supplied ad libitum resulting in average intakes of 208 ± 31.8 g of DM/animal/d. Each period included 25 d for adaptation to diet and 8 d for sampling the 3 last for CH₄ measurement in chambers. The ACB diet resulted in a 38.3% reduction (P = 0.001) in CH₄ emissions, and increased (P ≤ 0.048) average proportions of linolenic, linoleic and total polyunsaturated fatty acids in milk. The amino acid profile and concentration were unaffected by diet, but the proportion of phenylalanine was lower (P = 0.039) in ACB milk compared to the control diet. It is concluded that feed blocks based on tomato fruits wastes could replace 35% of the concentrate in dairy goats diet without detrimental effects on milk production and fatty acid or amino acid composition. Overall, diet including tomato feed blocks promoted the production of milk with healthier fatty acid profile and reduced feeding cost and the environmental damage caused by CH₄ emissions, compared with a conventional diet.

Keywords. Goat- Feed blocks - Tomato - Methane - Milk - Fatty acids -, Amino acids.

Effet de la substitution partielle du concentré par des blocks alimentaires avec du tomate procedant des cultures sous serre sur la production de methane et du lait et sa composition

Resumé. L'objectif du présent travail était d'étudier, chez les chèvres laitières, l'effet de remplacer 35% de concentré dans l'alimentation animale par de blocks alimentaires incluant déchets de fruits de tomate sur les émissions de CH₄, le rendement en lait les profils en acides gras et en acides aminés. Huit chèvres de la race Granadina (39,6 ± 1.89 kg poids vive) dans le milieu de la troisième lactation ont été utilisées, et deux essais ont été réalisés suivant un schéma croisé. Dans chaque essai, 4 animaux au hasard ont reçu 1,0 kg de foin de luzerne (AH), plus 1 kg de concentré (régime AC) et les autres 4 ont reçu 1,0 AH kg plus 0,65 kg de concentrés et des blocs alimentaires qui contenaient de tomates fourni ad libitum (régime ACB). Le régime ACB a entraîné une réduction de 38,3% (P = 0,001) dans les émissions de CH₄, et une augmentation dans le lait (P ≤ 0,048) des proportions moyennes d'acide linoléique, linoléique et des acides gras polyinsaturés totaux. Le profil d'acides aminés et de concentration n'ont pas été affectés par le régime, mais la proportion de la phénylalanine a été plus faible (P = 0,039) dans le lait des animaux recevant le régime ACB par rapport au témoin. Il est conclu que le régime ACB dans l'alimentation de la chèvre favorise la production de lait avec un profil d'acides gras sains plus saine en réduisant le coût d'alimentation et les dégâts environnementaux de la production caprine due a la diminution des émissions de méthane.

Most clés. Chèvre - Blocs alimentaires - Tomate - Méthane - Lait - Acides gras - Acides aminés

I – Introduction

Ruminant production in the Mediterranean area is limited by the poor quality and scarcity of pasture. Thus concentrates based on cereals are frequently used, but increase in cereal prices has driven the attention of ruminant nutritionists toward local alternatives (Ben Salem & Znaidi, 2008). Greenhouse horticulture is very important in the area, producing large amount of wastes, which could be an alternative to cereals for ruminants. Feed blocks manufacturing allows the inclusion of high-moisture wastes in animal feeding (Ben Salem and Nefzaoui, 2003). Milk fatty acid profile can be manipulated by the inclusion of some agro-industrial by-products in the diet depending on their energy value, fatty acid composition and fibre content (Vasta et al., 2008). Nevertheless, few studies have investigated the use of by-products in dairy goats, analysing milk fatty acid composition (Molina-Alcaide et al., 2010a; Modaresi et al., 2011). As for conventional protein sources, the success of the utilization of alternative protein sources in dairy goat feeding depends on the ability to formulate diets balanced in essential amino acids. However, the amino acid composition of alternative protein sources has been poorly characterized. In addition, none of the feeding systems currently available for sheep and goats allows amino acid balancing (Vasta et al., 2008). Moreover the presence of plant secondary and other unknown compounds in greenhouse wastes could modify rumen fermentation and thus, methane emission (Newbold et al., 2004) which has an important pollutant potential and represents a loss of energy intake in the ruminant. The aim of the present experiment was to study, in dairy goats, the effect of replacing 35% of concentrate in the diet with feed blocks including wastes from tomato fruits on CH₄ emission and on milk yield and fatty acid and amino acid profiles.

II – Materials and methods

Eight Granadina goats (39.6 ± 1.89 kg BW) in the middle of the third lactation were used, and 2 trials were carried out following a crossover design. In each trial, 4 animals randomly received 1.0 kg of alfalfa hay (AH) plus 1 kg of concentrate (diet AC) and the other 4 received 1.0 kg AH plus 0.65 kg of concentrate plus feed blocks (B) including greenhouse wastes of tomato (diet ACB) with 8 replications per diet at the end of the trials. Animals were individually kept in boxes with free access to food and water. All the diet ingredients were supplied once a day. Ingredient composition of concentrate and tomato FB is shown in Table 1. The amounts of AH and concentrate supplied to the animals fed diet AC were sufficient to allow daily milk

production of up to 2 kg per goat (Aguilera et al., 1990). The feed block was supplied ad libitum, resulting in average intakes of 208 ± 31.8 g of DM/animal/d for ACB diet. Each trial consisted of 25- d for adaptation and 8-d for sampling. Individual intakes of diet ingredients were registered through the whole trial. Goats were hand-milked once a day before feeding and milk yield recorded and milk density was measured and aliquots were stored at -30°C without preservatives until analyzed. The last 3 days of each trial animals were individually placed into square polycarbonate chambers (1.8 × 1.8 × 1.5 m) to measure CH₄ emissions. Ground (1-mm) samples of ingredients were analyzed for dry matter (DM), organic matter (OM), ether extract (EE) and total N (Table 2) according to the AOAC (2005). The NDF and ADF were analyzed according to van Soest et al. (1991) using an ANKOM Model 220 Fiber Analyzer (Macedon, NY, USA) with α - amylase for NDF analysis in concentrate samples and both NDF and ADF contents referred to ash-free weight. The ADL was determined by solubilisation of cellulose with 72% sulphuric acid. The energy content was analysed using an oxygen bomb calorimeter (PARR 1356, Biometer). Total N content in feedstuffs and milk was determined as described by (Molina-Alcaide et al., 2010a). Extraction of total fatty acids in feedstuffs was based on the method of Folch et al. (1957), with modifications (Devillard et al., 2006). Total fatty acids in milk were extracted as described by Toral et al. (2011). The amino acid N (AA-N) content in samples of feeds and milk was determined by HPLC using the Waters® (Waters Corporation, Mildford, MA, USA) following the procedures described by Molina-Alcaide et al. (2010b). Methane emission was calculated from CH₄ concentration analysed using a gas analyzer ADM MGA3000 (Spurling Works, Herts, UK) and airflows into and out of each chamber. Data were analyzed by GLM using repeated measures ANOVA. Diet was considered as fix effect, and trial and animal as random effects. When a significant effect of diet was found, post hoc comparison of means was made using the DMS test. Differences were considered significant at P < 0.05 and P < 0.10 values were declared as trends and discussed.

III – Results and discussion

The composition of diets in ingredients is shown in Table 1. The chemical composition of ingredients is shown in Table 2.

Capítulo 4

Table 1. Ingredients composition of concentrate and feed block (g/kg fresh matter).

Ingredient	Concentrate	Feed block
Wheat shorts	350	—
Corn grain	50	—
Barley	160	—
Tomato	—	585
Sunflower meal	120	36
Soybean hulls	90	—
Corn shorts	100	—
Soybean meal	90	—
Wheat straw	—	221
Beet molasses	—	100
Fatty acid salts	4.5	—
Quicklime	22	27
NaCl	3.5	16.2
Vitamin-mineral mixture ¹	25	3.6
Urea	—	11.7

¹Formulated (per kg) with NaCl, 277 g; ashes from the two-stage dried olive cake combustion, 270 g; (PO₄)₂H₄Ca, 250 g; MgSO₄, 200 g; CuO, 184 mg; I, 25 mg; CoO, 8.5 mg; Se, 4 mg; ZnO, 2.28 mg; and 83,500 and 16,700 IU of vitamins A and D, respectively.

The alfalfa hay intake (data not shown) was similar in goats receiving diets AC and ACB indicating absence of forage substitution with feed block in agreement with Ben Salem and Nefzaoui (2003). Diet did not affect total dry matter intake or animals live weight (data not shown). The average values for CH₄ emissions over the 2 trials were 28.2 and 17.4 g of CH₄/kg of DMI for AC and ACB diets, respectively. These values are similar to other published data using the sulphur hexafluoride tracer technique and respiratory chambers with sheep fed different practical diets (Blaxter & Clapperton 1965; Pinares-Patiño et al., 2007). The ACB diet resulted in a 38.3% reduction (P=0.001) of CH₄ emission (Table 3). It has been reported that plant secondary compounds, like tannins or saponins, could modify rumen fermentation, inhibiting enteric methanogenesis (Guo et al., 2008; Patra & Saxena, 2010). The presence of these compounds in tomato byproducts may have contributed to the methane reduction observed when feeding diets including feed block with tomato.

Table 2. Chemical composition (g/kg DM) and gross energy (GE) of diets ingredients (n=3).

Item	Alfalfa hay	Concentrate	Feed block
DM, g/kg	906	926	907
OM	881	893	814
CP	212	170	165
NDF	417	338	466
ADF	251	143	273
ADL	59	25	44.7
Ether	13.8	34.1	7.29
GE, MJ/kg	18.2	18.2	16.0

Milk yield, as well as fat and protein concentrations, were not affected ($P \leq 0.907$) by the inclusion of feed block in the diet, which may be due to the similar energy concentration and rumen protein degradability of both diets. However, Molina-Alcaide et al. (2010a) obtained lower milk yield and fat proportion with diets including feed block containing crude two-stage olive cake diets compared with a control diet based on alfalfa hay and concentrate. Dietary intakes of linoleic (LA; c9c12 C18:2) and linolenic (LNA; c9c12c15 C18:3) acids (table 3) showed that goats feeding the diet including tomato feed block consumed less unsaturated fatty acids than those under the control diet. However, milk from goats fed the diet including block showed higher content of LA (P=0.048), LNA (P=0.028) and total polyunsaturated fatty acids (PUFA) (P=0.012); a concomitant tendency (P=0.054) to decrease C18:0 (SA) concentration (11%) was also observed when tomato feed block was fed. Regarding c9t11CLA and t11C18:1 (VA) concentrations, milk fat of goats on tomato feed block diet remained unchanged (P=0.487 and P=0.473, respectively) in comparison to milk from animals fed diet AC. The higher (P<0.033) accumulation of t11c15 C18:2 in milk from goats fed diet including tomato feed block would suggest an incomplete biohydrogenation of LNA. In addition to the fatty acid supply, other factors such as energy supply (Leiber et al., 2005), the proportion of fibre (Dewhurst et al., 2006) or concentrate (Tsiplakou & Zervas, 2008) as well as the presence of plant secondary compounds (Vasta et al., 2009) should be considered when dietary effects on milk fatty acid profile are assessed. Since the fatty acid supply was lower in the ACB diet than in the AC diet, and taking into account that energy and fiber intakes were similar for goats fed both diets (data not shown), it might be that the observed effect in milk fatty acid composition could have been due to the administration of the ingredients in the feed block. The synchronous and fractionated supply of nutrients allowed when using feed blocks in ruminants feeding (Ben Salem & Nefzaoui, 2003) may have been associated to a better fatty acid absorption in the small intestine. Additionally, it could be speculated that during the manufacture of the block tomato seeds were partially crushed so

Table 3. Methane emissions, milk production and fatty acid composition, milk recovery rate and intake of selected fatty acids of goats fed with different experimental diets.

Item	Diet ¹		SEM	P-value
	AC	ACB		
CH ₄ emission, L/kg DMI	28.2 ^b	17.4 ^a	0.819	0.001
Milk yield, ml/d	997	922	94.16	0.372
Total fat, g/L milk	56.2	56.8	3.589	0.846
Fatty acids, g/100 g of identified FA				
Saturated FA				
C4:0	1.54	1.39	0.093	0.312
C6:0	2.41	2.32	0.097	0.416
C8:0	3.06	2.98	0.121	0.593
C10:0	11.7	11.7	0.328	0.867
C11:0	0.11	0.12	0.015	0.476
C12:0	6.01	6.45	0.364	0.287
C14:0	10.9	11.1	0.238	0.507
C15:0	0.80	0.86	0.041	0.074
iso C15:0	0.19	0.21	0.018	0.200
anteiso C15:0	0.27	0.29	0.019	0.189
C16:0	29.6	28.6	0.743	0.136
C17:0	0.51 ^a	0.57 ^b	0.021	0.001
anteiso C17:0	0.34 ^a	0.38 ^b	0.020	0.001
C18:0	6.93	6.15	0.674	0.054
C20:0	0.19	0.18	0.013	0.351
C21:0	0.058	0.069	0.006	0.200
C22:0	0.053	0.049	0.006	0.598
Total saturated FA	74.7	73.4	0.650	0.319
Monounsaturated FA				
c9 C14:1	0.20 ^a	0.24 ^b	0.025	0.042
c9C16:1	0.74 ^a	0.80 ^b	0.076	0.017
² t9C16:1	0.62	0.64	0.024	0.613
³ c9C18:1	15.9	16.1	0.696	0.869
c11C18:1	0.30	0.35	0.018	0.323
c12C18:1	0.20	0.25	0.022	0.173
c13C18:1	0.042	0.047	0.003	0.763
c16C18:1	0.045	0.044	0.005	0.999
t5C18:1	0.020	0.021	0.003	0.998
t6+t7+t8C18:1	0.20	0.24	0.020	0.189
t9C18:1	0.22	0.26	0.017	0.324
t10C18:1	0.33	0.43	0.052	0.208
t11C18:1	0.82	0.89	0.086	0.473
c11C20:1	0.071	0.075	0.006	0.598
Total Monounsaturated FA	19.7	20.3	0.672	0.565
Polyunsaturated FA				
c9c12C18:2	1.94 ^a	2.17 ^b	0.069	0.048
c9t12C18:2	0.054	0.049	0.008	0.752
c9t11CLA	0.57	0.62	0.061	0.487
t8c13C18:2	0.090	0.093	0.007	0.654
t9c12C18:2	0.030	0.036	0.003	0.170
t11c15C18:2	0.037 ^a	0.053 ^b	0.006	0.033
c6c9c12C18:3	0.017	0.025	0.002	0.503
c9c12c15C18:3	0.39 ^a	0.54 ^b	0.035	0.028
C20:3 n-6	0.020	0.027	0.005	0.244
C20:4 n-6	0.20	0.23	0.012	0.082
Total Polyunsaturated FA	3.34 ^a	3.83 ^b	0.149	0.012
According to origin ⁴				
< 16 carbon FA	37.2	37.6	0.763	0.712
16 carbon FA	30.9	30.0	0.744	0.158
> 16 carbon FA	29.6	29.9	1.18	0.830
Σn3/Σn6	0.179	0.218	0.011	0.149

Capítulo 4

Table 3. Continue

Item	Diet ¹		SEM	P-value
	AC	ACB		
FA recovery rate, (g of FA excreted in milk/g of FA intake)				
c9c12c15C18:3	0.090	0.12	0.011	0.063
c9c12C18:2	0.13 ^a	0.17 ^b	0.020	0.021
³ c9C18:1	1.16 ^a	1.48 ^b	0.194	0.012
C18:0	1.57	1.63	0.204	0.569
FA intake (mg/d)				
c9c12c15C18:3	2391	2249	99.1	0.195
c9c12C18:2	8968 ^b	6787 ^a	96.7	0.001
³ c9C18:1	7955 ^b	5642 ^a	60.2	0.001
C18:0	2451 ^b	1892 ^a	21.7	0.001

¹AC = Alfalfa hay and concentrate (1:1); ACB = alfalfa hay, concentrate (1:0.65) and tomato feed block.

²Contains iso C17:0. ³Contains trans-12, cis-10+trans-15 C18:1 as minor components. ⁴< 16 carbon FA represent de novo synthesized FA, > 16 carbon FA represent preformed FA taken up from circulation, and 16 carbon FA are derived from both sources. *About 2.4 of non identified fatty acids.

one fraction of fatty acids may have been accessible to biohydrogenating bacteria leading to accumulation of biohydrogenation intermediates, whereas another fraction could have been still protected and therefore higher amounts of PUFA would have been available in the small intestine for absorption. Fatty acid recovery rates were higher for LA and oleic acid (OA; c9C18:1) when feeding diet ACB which would support the previous speculation. This finding was in agreement with those of Abbeddou et al. (2011) and Khiaosa-Ard et al. (2010) who showed increased linoleic acid recovery rates in milk following decreased linoleic acid intakes. Also, other components of the tomato by-products might have been involved in the observed effect; for example, tannins and saponins have been shown to be of potential usefulness in controlling biohydrogenation (reviewed by Lourenço et al., 2010). Overall, milk of goats fed tomato block diet could be considered of healthier fatty acid composition as increased amounts of LA and LNA (1.12 and 1.38 fold, respectively) in the milk would be important due to their beneficial effects in the prevention of cardiovascular diseases and hypertension in humans.

Total N and amino acid profile of milk (Table 4) were unaffected by diet ($P \geq 0.215$) with the exception of phenylalanine that was lower ($P = 0.039$) in the milk of goats fed diet ACB compared to AC. Taking into account the relative proportions of cereals in concentrate and in feed blocks, their average intakes in the current study, and the cost of cereals and milk, a reduction in feeding cost of 22% may be achieved

with diets containing feed blocks compared to the control diet.

Table 4. Total N and amino acids profile of goats milk fed with different experimental diets.

Item	Diet ¹		SEM	P-
	AC	ACB		
Total N, mg/g DM	40.6	40.4	1.21	0.907
Total amino acids, g/L milk	5.10	4.91	0.234	0.451
Total amino acids ² , g/100g total N	84.0	84.6	2.78	0.900
AA, g/100 g total AA				
Aspartic acid	6.38	6.69	0.254	0.244
Glutamic acid	18.5	18.6	0.331	0.867
Serine	4.47	4.64	0.091	0.332
Glycine	1.72	1.75	0.042	0.667
Histidine	3.57	3.59	0.044	0.753
Arginine	2.50	2.79	0.113	0.237
Threonine	4.62	4.63	0.096	0.962
Alanine	3.10	3.15	0.131	0.687
Proline	8.20	8.28	0.189	0.791
Tyrosine	4.61	4.70	0.168	0.528
Valine	5.54	5.49	0.141	0.843
Methionine	8.15	7.65	0.571	0.744
Cysteine	4.14	4.23	0.419	0.902
Isoleucine	4.38	4.31	0.041	0.460
Leucine	7.53	7.43	0.123	0.592
Phenylalanine	4.28 ^b	4.12 ^a	0.073	0.039
Lysine	8.31	7.94	0.104	0.215
EAA ³	48.9	48.0	0.489	0.290
NEAA ⁴	51.1	52.0	0.480	0.285

¹AC = Alfalfa hay and concentrate (1:1); ACB = alfalfa hay, concentrate (1:0.65) and tomato feed block. ²Without tryptophane.

³EAA: threonine, arginine, valine, methionine, isoleucine, leucine, phenylalanine, lysine and histidine. ⁴NEAA: alanine, aspartic acid, glutamic acid, glycine, proline, serine, tyrosine and cysteine.

IV – Conclusions

Feed blocks based on tomato fruits wastes could replace 35% of the concentrate in dairy goats diet without detrimental effects on milk production and fatty acid or amino acid composition. Overall, diet including tomato feed blocks promoted the production of milk with healthier fatty acid profile and reduced feeding cost and the environmental damage of CH₄ emissions compared with a conventional diet.

Acknowledgements

The authors wish to acknowledge the financial support from the Junta de Andalucía (Excellence Projects P05-AGR-0408 and P07-RNM-02746). Manuel Romero and Eva Ramos are grateful to the CSIC for JAE-CSIC grant and JAE-POSTDOC contract, respectively. Thanks to J. Fernandez and T. Garcia for technical assistance. Thanks for the Plant of Wastes Treatment Factory in Motril (Granada, Spain) for providing us with tomato fruits wastes.

References

- Association of Official Analytical Chemists, Gaithersburg, MD, USA., 2005. Official methods of Analysis. 18th ed.
- Abbeddou, S. Rischkowsky, B. Richter, E.K. Hess, H.D. and Kreuzer, M., 2011. Modification of milk fatty acid composition by feeding forages and agro-industrial byproducts from dry areas to Awassi sheep. In: *J. Dairy Sci.*, **94**. p. 4657-4668.
- Aguilera, J.F. Prieto, C. and Fonollá, J., 1990. Protein and energy metabolism of lactating Granadina goats. In: *Br. J. Nutr.*, **63**. p. 165-75.
- Ben Salem, H. and Nefzaoui, A., 2003. Feed blocks as alternative supplements for sheep and goats. In: *Small Ruminant Res.*, **49**. p. 275-288.
- Ben Salem, H. and Znaidi, I., 2008. Partial replacement of concentrate with tomato pulp and olive cake-based feed blocks as supplements for lambs fed wheat straw. In: *Anim. Feed Sci. Technol.*, **147**. p. 206-222.
- Blaxter, K.L. and Clapperton, J.L., 1965. Prediction of the amount of methane produced by ruminants. In: *Br. J. Nutr.*, **19**. p. 511-522.
- Devillard, E. McIntosh, F.M. Newbold, C.J. and Wallace, R.J., 2006. Rumen ciliate protozoa contain high concentrations of conjugated linoleic acids and vaccenic acid, yet do not hydrogenate linoleic acid or desaturate stearic acid. In: *Br. J. Nutr.*, **96**. p. 697-704.
- Dewhurst, R. Shingfield, K. Lee, M.R.F. and Scollan, N.D., 2006. Increasing the concentrations of beneficial polyunsaturated fatty acids in milk produced by dairy cows in high-forage systems. In: *Anim. Feed Sci. Technol.*, **131**. p. 168-206.
- Folch, J. Lees, M. and Sloane-Stanley, G., 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. In: *J. Biol. Chem.*, **226**. p. 497-509.
- Guo, Y.Q. Liu, J.-X. Lu, Y. Zhu, W.Y. Denman, S.E. and McSweeney, C.S., 2008. Effect of tea saponin on methanogenesis, microbial community structure and expression of *mcrA* gene, in cultures of rumen micro-organisms. In: *Lett Appl Microbiol.*, **47**. p. 421-426.
- Khiaosa-Ard, R. Klevenhusen, F. Soliva, C.R. Kreuzer, M. and Leiber, F., 2010. Transfer of linoleic and linolenic acid from feed to milk in cows fed isoenergetic diets differing in proportion and origin of concentrates and roughages. In: *J. Dairy Res.*, **77**. p. 331-336.
- Leiber, F. Kreuzer, M. Nigg, D. Wettstein, H.R. and Scheeder, M.R. Leo., 2005. A study on the causes for the elevated n-3 fatty acids in cows' milk of alpine origin. In: *Lipids.*, **40**. p. 191-202.
- Lourenço, M. Ramos-Morales, E. and Wallace, R.J., 2010. The role of microbes in rumen lipolysis and biohydrogenation and their manipulation. In: *Animal.*, **4**. p. 1008-1023.
- Modaresi, J. Fathi Nasri, M. Rashidi, L. Dayani, O. and Kebreab, E., 2011. Short communication: Effects of supplementation with pomegranate seed pulp on concentrations of conjugated linoleic acid and puniceic acid in goat milk. In: *J. Dairy Sci.*, **94**. p. 4075-4080.
- Molina-Alcaide, E. Morales-García, E.Y. Martín-García, A.I. Ben Salem, H. Nefzaoui, A. and Sanz-Sampelayo, M.R., 2010a. Effects of partial replacement of concentrate with feed blocks on nutrient utilization, microbial N flow, and milk yield and composition in goats. In: *J. Dairy Sci.*, **93**. p. 2076-2087.
- Molina-Alcaide, E. Martín-García, A.I. Moumen, A. and Carro, M.D., 2010b. Ruminant fermentation, microbial growth and amino acid flow in single-flow continuous culture fermenters fed a diet containing olive leaves. In: *J. Anim. Physiol. An. N.*, **94**. p. 227-236.
- Newbold, C. McIntosh, F. Williams, P. Losa, R. and Wallace, R., 2004. Effects of a specific blend of essential oil compounds on rumen fermentation. In: *Anim. Feed Sci. Technol.*, **114**. p. 105-112.
- Patra, A.K. and Saxena, J., 2010. A new perspective on the use of plant secondary metabolites to inhibit methanogenesis in the rumen. In: *Phytochemistry.*, **71**. p. 1198-1222.

Capítulo 4

- Pinares-Patiño, C.S. Holmes, C.W. Lassey, K.R. and Ulyatt, M.J., 2007.** Measurement of methane emission from sheep by the sulphur hexafluoride tracer technique and by the calorimetric chamber: failure and success. In: *Animal.*, **2**. p. 141-148.
- Soest, P.J. Van, Robertson, J.B. and Lewis, B.A., 1991.** Methods for Dietary Fiber, Neutral Detergent Fiber, and Nonstarch Polysaccharides in Relation to Animal Nutrition. In: *J. Dairy Sci.*, **74**. p. 3583–3597.
- Toral, P.G. Hervás, G. Bichi, E. Belenguer, Á. and Frutos, P., 2011.** Tannins as feed additives to modulate ruminal biohydrogenation: Effects on animal performance, milk fatty acid composition and ruminal fermentation in dairy ewes fed a diet containing sunflower oil. In: *Anim. Feed Sci. Technol.*, **164**. p. 199-206.
- Tsiplakou, E. and Zervas, G., 2008.** Comparative study between sheep and goats on rumenic acid and vaccenic acid in milk fat under the same dietary treatments. In: *Livest Sci.*, **119**. p. 87–94.
- Vasta, V. Nudda, A. Cannas, A. Lanza, M. and Priolo, A., 2008.** Alternative feed resources and their effects on the quality of meat and milk from small ruminants. In: *Anim. Feed Sci. Technol.*, **147**. p. 223-246.
- Vasta, V. Makkar, H.P.S. Mele, M. and Priolo, A., 2009.** Ruminal biohydrogenation as affected by tannins in vitro. In: *Br. J. Nutr.*, **102**. p. 82-92.

Capítulo 5
Discusión general

Capítulo 5

Con objeto de incluir desechos de tomate y pepino procedentes de su cultivo en invernaderos, se ha utilizado una tecnología simple y de bajo coste, que permite incluir materiales ricos en agua, lo que facilita el reciclado de los mismos en la alimentación de rumiantes así como su almacenamiento. Se han estudiado los efectos de reemplazar una parte del concentrado en dietas basadas en heno de alfalfa por distintos tipos de bloques realizando, de manera secuencial, ensayos *in vitro* e *in vivo*, tanto con animales en mantenimiento como en lactación. Con el fin de comparar la utilización de destríos de tomate y pepino con un cereal muy empleado en alimentación de rumiantes, se han utilizado también bloques que incluían cebada grano.

Los sistemas de producción caprina suelen desarrollarse en países de climatología adversa en los que la escasez de agua repercute negativamente en la producción agrícola y reduce la disponibilidad y calidad de los pastos. En consecuencia, resulta necesario emplear grandes cantidades de concentrados, elaborados a base de cereales principalmente, lo que incrementa notoriamente los costes de alimentación (Ben Salem y Nefzaoui, 2003; Wright et al., 2004a).

Un residuo agrícola es aquella fracción o fracciones de un cultivo que no constituye la cosecha propiamente dicha o, aquella parte de la cosecha que no cumple los requisitos de calidad mínima para ser comercializada como tal (Infoagro.com). Puesto que el panorama de precios de los cereales para los próximos años no es alentador, alimentos no convencionales como los subproductos y desechos agroindustriales, pueden representar una vía para reducir el uso de concentrados si con ello no se compromete la productividad o calidad de los productos animales (Boza et al., 1985; Aghsaghali y Maheri-Sis, 2008; Vasta et al., 2008).

La agricultura intensiva genera volúmenes importantes de destríos cuya utilización, por el ganado caprino, podría permitir períodos de descanso a la cobertura herbácea así como completar las dietas de los animales en épocas de escasez de pastos (Boza et al., 1985). Andalucía cuenta, además, con más del 70% de la superficie de cultivo de invernadero, siendo el tomate y el pepino dos de los productos hortofrutícolas más abundantes del sector primario en España (10.700 y 1.620 Ha, respectivamente; MARM, 2011). De cara a su empleo como alimentos para rumiantes, en Andalucía, los desechos de frutos de tomate y pepino de invernaderos presentan la ventaja de estar disponibles durante la mayor parte del año en cantidades importantes. No obstante, su origen, la época del año o la variedad

cultivada son factores de variación en la composición química de los subproductos (Grasser et al., 1995; Mussatto et al., 2006; Aghsaghali y Maheri-Sis, 2008). En este sentido, una ventaja de los desechos empleados en este trabajo, se debe a que su composición química no varió en distintas épocas del año (**Tabla 5.1**).

Tabla 5.1. Composición química de destríos de tomate y pepino en diferentes épocas del año 2008.

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

En la actualidad, los dos grandes ejes de la PAC son el apoyo a la competitividad de los productores europeos y el fomento de las zonas rurales, especialmente de las menos favorecidas. La producción ha de ser respetuosa con el medio ambiente y el bienestar animal y generar productos de calidad (PAC, 2012). Este contexto europeo podría suponer, a largo plazo, la desaparición de ciertas explotaciones de caprino, en especial de aquellas con un carácter más tradicional (Castel et al., 2010). La incorporación de destríos de invernadero, cuya gestión medioambiental constituye un gran problema debido a su elevado contenido en agua, en la alimentación de ganado caprino, podría ayudar al productor. Además, como algunos autores sugieren (Newbold et al., 2004; Guo et al., 2008; Powell et al., 2009; Wang et al., 2009; Woodward et al., 2009; Ben Salem y Makkar, 2010; Molina-Alcaide et al., 2010a; Patra y Saxena 2010; Greenwood et al., 2012) la utilización de subproductos en alimentación animal puede tener ventajas derivadas de la presencia de determinados compuestos, con efectos sobre la reducción de las emisiones de metano, la excreción de nitrógeno en orina o que mejoren la calidad de los productos.

5.1. Efectos de distintos tipos de bloques multinutrientes, que contienen destríos de invernaderos y de distintos niveles de sustitución de concentrado sobre la fermentación ruminal *in vitro*

Los resultados *in vitro* (**experimento 1**) no mostraron efecto de los distintos tipos de bloques ensayados sobre los parámetros de la fermentación ruminal, quedando patente

Capítulo 5

su potencial para sustituir la cebada. Sin embargo, el nivel de sustitución de concentrado por bloque promovió diferencias en la fermentación ruminal, que disminuyó a medida que aumentaba el porcentaje de sustitución del concentrado por los bloques. Las diferencias pueden deberse, fundamentalmente, al aumento del contenido en carbohidratos estructurales de la dieta y a la reducción en carbohidratos fácilmente degradables (Blaxter y Clapperton, 1965; Beever et al., 1989; Johnson y Johnson, 1995) que tiene lugar al aumentar la cantidad de bloque. El incremento del nivel de sustitución del concentrado por bloques redujo la producción de gas y la velocidad de degradación, lo que conducía a una menor digestibilidad de la MS y FND de las dietas que contenían bloques, de acuerdo con las observaciones de Ben Salem y Nefzaoui, (2003), en corderos alimentados con bloques multinutrientes que contenían pulpa de tomate y orujo de aceituna. Sin embargo, nuestros resultados contradicen las observaciones de numerosos autores y de trabajos anteriores de nuestro grupo, que han dejado patente los efectos beneficiosos de la inclusión de bloques multinutrientes sobre el aprovechamiento de la dieta y distintos parámetros productivos en pequeños rumiantes (Ben Salem et al, 2000, 2001; Makkar y Jayasuriya, 2000; Gasmi-Boubaker et al, 2006 a,b; Ben Salem y Znaidi, 2008; Khampa et al., 2009; Molina-Alcaide et al., 2009, 2010a). Los efectos de los bloques dependen fundamentalmente de lo adecuado de su formulación, del aporte de nutrientes y de la sincronización entre el aporte de energía y nitrógeno que promuevan. Un aporte fraccionado y sincronizado de los nutrientes procedentes de los bloques multinutrientes mejora el aprovechamiento de subproductos y forrajes de calidad media y baja (Ben Salem y Nefzaoui, 2003). Pero la interpretación de los resultados obtenidos *in vitro* requiere la consideración de los inconvenientes asociados a este tipo de técnicas (López, 2005).

La sustitución de concentrado por bloques multinutrientes también mostró *in vitro* un efecto antimetanogénico. Así, la reducción de la proporción CH₄/AGVs totales, observada al aumentar la cantidad de bloque en la dieta, indica una menor formación de metano (mL) por unidad de ácidos grasos (mmoL) producidos. La producción de metano puede reducirse por la presencia de compuestos secundarios (fenóles, saponinas, alcaloides, aminoácidos no proteicos, aceites esenciales, glicósidos, etc), en los bloques, cuyos mecanismos de acción en la metanogénesis no están aun claros (Newbold et al., 2004; Guo et al., 2008; Ben Salem, 2010; Grainger et al., 2010; Patra y Saxena, 2010). No se observó un aumento concomitante de la cantidad de propiónico, que es un

sumidero del H^+ alternativo al metano. Otros mecanismos y rutas metabólicas, pueden intervenir en la inhibición de la síntesis de metano, como la homoacetogénesis (Yu y Morrison, 2004). No obstante, si se tiene en cuenta que *i*) el aumento de la presión de H^+ en el rumen inhibe la fermentación microbiana de los carbohidratos en ese compartimento del digestivo y, que *ii*) la reducción en la producción de metano, observada en este experimento, con niveles crecientes de sustitución de concentrado por bloques, va acompañada de una inhibición de la fermentación ruminal, parece que el efecto antimetanogénico de los bloques no estuvo asociado a ningún sumidero de electrones alternativo. Tampoco se ha observado una correlación entre el efecto antimetanogénico de las dietas que incluían bloques y la abundancia de archaeas metanogénicas (Firkins y Yu, 2006). De hecho se especula que las variaciones en la metanogénesis ruminal pueden depender de la expresión génica, diversidad y estructura de las poblaciones de microorganismos metanogénicos presentes, aunque se desconoce qué géneros o especies son responsables en mayor medida (Yu y Morrison 2004; Morgavi et al., 2010; Wright y Klieve, 2011).

Los datos obtenidos, en cuanto a la producción de gas, CH_4 y AGVs, digestibilidad verdadera de la MS y FND, así como las poblaciones microbianas presentes en los CNRMR muestran que la incorporación de un 50-75% de destríos de invernadero (tomate y pepino) en la dieta sería el rango más adecuado para su utilización en posteriores experimentos *in vivo*.

5.2. Potencial de los bloques multinutrientes, que incluyen subproductos de invernaderos, como estrategia alternativa al uso de concentrados en la dieta de caprino

La información derivada de los resultados del **experimento 1** y de una prueba adicional de palatabilidad determinó el nivel de sustitución de concentrado y el tipo de bloques a utilizar en los **experimentos 2 y 3** así como ciertas modificaciones en la formulación de los bloques para mejorar el suministro de nutrientes (**Tabla. 5.2**).

Capítulo 5

Tabla. 5.2. Composición en ingredientes (g/kg materia fresca) de los bloques multinutrientes utilizados en los ensayos *in vitro* en *in vivo*.

Ingredientes	Bloque ¹			
	Tomate	Pepino	Tomate y Pepino	Cebada
<i>In vitro</i>				
Tomate	650	0	243	0
Pepino	0	650	407	0
Cebada	0	0	0	31,8
Paja de cereal	245	245	245	245
Torta de Girasol	40	40	40	40
Urea	13	12	12	13
Cal	30	30	31	30
Sal	18	18	18	18
Mezcla MVT ²	3,6	3,6	3,6	3,6
<i>In vivo</i>				
Tomate	585	0	-	0
Pepino	0	585	-	0
Cebada	0	0	-	28,6
Paja de cereal	221	221	-	221
Torta de Girasol	36	36	-	36
Melaza	100	100	-	100
Urea	11,7	11,7	-	11,7
Cal	27	27	-	27
Sal	16,2	16,2	-	16,2
Mezcla MVT ²	3,6	3,6	-	3,6

¹Bloques multinutrientes que contienen destriós de tomate, pepino, tomate y pepino (1:1) o cebada, respectivamente. ²Mezcla minero-vitamínica formulada (por kilogramo) con NaCl, 277 g; cenizas procedentes de la combustión de alperujo, 270 g; (PO₄)₂H₄Ca, 250 g; MgSO₄, 200 g; CuO, 184 mg; I, 25 mg; CoO, 8,5 mg; Se, 4 mg; ZnO, 2,28 mg; y 83.500 y 16.700 UI de vitaminas A y D, respectivamente.

En la última década, el precio de los cereales ha experimentado un incremento de aproximadamente un 48% (FAO, 2011). En 2011 los precios del trigo, cebada y maíz se situaron en 241, 219 y 216 euros por tonelada en 2011, respectivamente, lo que supuso un incremento del 35% con respecto a marzo del año 2010 (Boletín Mensual de Estadística del MARM, Marzo del 2012). La utilización de bloques multinutrientes redujo un 50% (**experimento 2**) o 35% (**experimento 3**) la cantidad de concentrado en la dieta del caprino en mantenimiento y lactación, respectivamente, con la consiguiente reducción en la cantidad de cereales empleados y, por tanto, en el coste de la ración. Se estima que esta estrategia alimentaria, basada en el uso de bloques para reducir el concentrado, reduce el coste de la alimentación del 32% (animales en mantenimiento) al 22% (animales en lactación) en línea con los resultados de otros trabajos que han incluido bloques

multinutrientes en dietas de rumiantes (El Hag et al., 2002; Ben Salem and Znaidi, 2008; Molina-Alcaide et al., 2010a).

5.2.1. Digestibilidad y balance de nutrientes

La información bibliográfica acerca del valor energético y proteico de alimentos en pequeños rumiantes procede, fundamentalmente, de trabajos realizados con la especie ovina, utilizada como modelo de rumiantes en los países desarrollados. A ello se debe la escasez de trabajos, referidos a esta área de conocimiento, en la especie caprina (ARC, 1984; AFRC, 1998). Además, la mayoría de los trabajos realizados se han llevado a cabo en condiciones climatológicas y con alimentos muy distintos a los que pueden emplearse en nuestro entorno. Por todo ello, el estudio en caprino, del valor energético y proteico de distintos tipos de dietas elaboradas a base de recursos autóctonos (destríos de tomate y pepino en este caso), en nuestras condiciones ambientales y de manejo y, con razas autóctonas, está bien justificado.

En los **experimentos 2 y 3**, las dietas se trataron de formular para que fueran isoenergéticas e isoproteicas y pudiesen atender las necesidades nutricionales de los animales en los distintos estadios fisiológicos (Aguilera et al., 1990; Prieto et al., 1990). Los bloques que incluían tomate, pepino y cebada, se suministraron *ad libitum* alcanzándose ingestas de $203 \pm 72,9$; $179 \pm 39,7$ y $144 \pm 68,1$ g de materia fresca por animal y día, en cabras en mantenimiento, y de $231 \pm 68,7$, $238 \pm 58,9$ y $223 \pm 88,4$ g de materia fresca por animal y día, en animales en lactación, respectivamente, con los bloques que incluían destríos de tomate y pepino, y cebada grano.

A pesar de que los bloques multinutrientes, que contienen destríos de tomate y pepino, pueden sustituir una parte del concentrado sin perjudicar de manera significativa la digestibilidad, la fermentación ruminal o los balances de N y energía, en cabras no productivas, la digestibilidad de la materia orgánica sí se vio afectada. El ARC (1980) establece valores variables de la cantidad de MO digestible que aparentemente fermenta en el rumen, en función del tipo de dieta consumida, siendo para dietas mixtas forraje-concentrado de 65% y 68% en vacuno y ovino, respectivamente, valores cercanos a los encontrados por Archimède et al. (1997) en una revisión. Los valores de digestibilidad aparente de la MS y MO, observados en cabras en mantenimiento (**experimento 2**), están en consonancia con los obtenidos por otros autores (Cerrillo et al., 1999; Islam et al., 2000; Tovar-Luna et al., 2007), quienes describen un aumento significativo de

Capítulo 5

dichos valores al incrementarse la cantidad de concentrado en la dieta. Por el contrario, en cabras en lactación, no se observó una disminución de la digestibilidad de MS y MO al reemplazar el 35% del concentrado por bloques, lo que podría indicar un mejor aprovechamiento de la dieta, en comparación con animales en mantenimiento, posiblemente debido al distinto estado fisiológico de los animales y/o al menor nivel de sustitución de concentrado por bloque, empleado en animales en lactación. El menor contenido en extracto etéreo de los bloques multinutrientes, en comparación con el concentrado, pudo determinar que la digestibilidad de la grasa fuera aproximadamente un 9 y un 15% menor para las dietas que contenían bloques en comparación con la dieta control, en animales en mantenimiento y en lactación, respectivamente. Además, e independientemente del tipo de bloque suministrado, las digestibilidades de la grasa y de la PB fueron mayores, y menores las de FND y FAD en cabras lactantes, comparadas con las no productivas.

Los valores de digestibilidad verdadera (van Soest et al., 1966), obtenidos en los ensayos *in vitro* (**experimento 1**) representan la degradación de los distintos nutrientes en el rumen. Dado que en ninguno de los ensayos *in vivo* se ha determinado la degradabilidad ruminal de las dietas, sino únicamente su digestibilidad aparente en el tracto digestivo, podrían existir ciertas limitaciones para realizar una comparación *in vivo* – *in vitro* en este aspecto. Sin embargo, se ha observado que la respuesta a la dieta es similar *in vivo* e *in vitro*, dada la relación existente entre la degradación del alimento en el rumen y su digestibilidad aparente en el tracto digestivo total (Cerrillo et al., 1999; Vicente et al., 2004). Ello pone de manifiesto el potencial de los sistemas *in vitro* CNRMR para evaluar la digestibilidad de dietas en las que se incluyen fuentes de nutrientes no convencionales.

La excreción de N en la orina y heces de los animales representa una importante fuente de contaminación medioambiental (Tamminga, 1996). Aunque esa excreción depende, fundamentalmente, del contenido en N de las dietas y de su digestibilidad (Devendra, 1989; Isac et al., 1994; Yáñez-Ruiz y Molina-Alcaide, 2007), la comparación de los resultados obtenidos en cabras en mantenimiento y en lactación parece indicar que el estado fisiológico del animal también juega un papel importante al respecto, sobre todo en la excreción de N en orina. Así, la utilización de dietas que incluían bloques con destríos de tomate y pepino en cabras en lactación promovió una menor excreción de N en orina que la dieta control o la que incluía bloques de cebada,

lo que podría ser consecuencia de una menor absorción de N en el rumen y una menor pérdida de N como consecuencia de una mejor sincronización entre la disponibilidad de energía y aminoácidos a nivel tisular (Tamminga, 1996) con las dietas que incluían aquellos bloques. Sin embargo, esto no se reflejó en la cantidad de N excretado en leche, aunque algunos autores indican que el contenido en proteína de la leche es un parámetro muy estable para una determinada especie animal y un pequeño cambio requiere de importantes modificaciones en el aporte proteico de la dieta (Jenkins y McGuire, 2006). El perjuicio potencial para el medio ambiente, que pudiera derivarse de la excreción de N en orina, sería menor en animales en producción, con altas demandas en N degradable, en comparación con los animales en mantenimiento (Waghorn et al., 1987; Tamminga, 1996; Powell et al., 2009; Woodward et al., 2009; Greenwood et al., 2012).

Los valores de digestibilidad y balance de N en cabras en lactación estuvieron en línea con los encontrados por Molina-Alcaide et al. (2010a) en cabras, también en lactación, alimentadas con dietas que incluían bloques con alperujo, aunque los balances de N encontrados en el presente trabajo eran superiores a los encontrados por esos autores. Los balances de N, más elevados en cabras en lactación que en las no productivas, reflejaban el estado fisiológico de los animales, con necesidades fisiológicas de N más elevadas en los productivos, para la incorporación de dicho N a la leche. La proporción de N ingerido, que fue retenido, varió entre un 16,7 y 26,4% en cabras en mantenimiento y entre 18,7 y 22,4% en cabras en lactación, estando dentro del rango de valores observados por otros autores en cabras en mantenimiento (Prieto et al., 1990; Domingue et al., 1991; Pralomkarn et al., 1995; Fujita et al., 2006; Yáñez-Ruiz y Molina-Alcaide, 2007, 2008) y en lactación (Aguilera et al., 1990; Sampelayo et al., 2002; Molina-Alcaide et al., 2010a). El balance de N en cabras en lactación muestra una eficiencia de utilización de este nutriente similar para las dietas control y las que incluían bloques con tomate y pepino. No obstante, en cabras en mantenimiento, el balance de N se vio ligeramente reducido con dietas que incluían bloques de tomate y pepino y, de manera drástica, cuando la dieta incluía los bloques de cebada. Todos los bloques incorporaban NNP, en forma de urea, cuya disponibilidad es más alta que la de las fuentes proteicas, y ello podría provocar un desacoplamiento entre la liberación de N y energía, sobre todo en animales en mantenimiento, con una menor demanda proteica, y en los que la proporción de concentrado sustituido por bloque fue mayor

Capítulo 5

(aproximadamente un 50%) que en cabras en lactación. Algunos autores han observado una retención positiva de N en animales que, teóricamente, se alimentaban a nivel de mantenimiento energético (Pralomkarn et al., 1995; Yáñez-Ruiz y Molina-Alcaide, 2007) o ligeramente por debajo de éste (Islam et al., 2000). Este hecho parece difícil de explicar si se considera que el estado no productivo de un animal es incompatible con la deposición de proteína, y parece más bien reflejar situaciones (Chandramoni et al., 2000), como la encontrada en nuestro caso, de retenciones de N positivas (Fujita et al., 2006) o negativas (Yáñez-Ruiz y Molina-Alcaide, 2007) carentes de significado biológico.

La sustitución parcial del concentrado por bloques multinutrientes promovió algunas diferencias en el balance energético, en animales productivos y no productivos, aunque, en ambos casos, no hubo cambios en la energía metabolizable, derivados del tipo de dieta suministrada a los animales. Tanto en cabras en mantenimiento como en lactación, alimentadas con dietas que incluían bloques multinutrientes, el aporte en energía digestible era menor que con la dieta control (Cerrillo et al., 1999; Islam et al., 2000; Tovar-Luna et al., 2007), viéndose compensada la ingesta en EM con una reducción en las excreciones de energía en orina y metano. A pesar de que las dietas se formularon para aportar la misma cantidad de energía, el consumo de energía de los animales alimentados con las dietas ACT, ACC y ACB fue ligeramente inferior al obtenido con la dieta control, sobre todo en animales en mantenimiento, aunque ello no repercutió significativamente en los parámetros productivos ni en el aprovechamiento de la dieta.

En general, tanto en animales en mantenimiento como en lactación, la sustitución parcial del concentrado por bloques multinutrientes, que contienen destríos de invernadero como el tomate y el pepino, no produce cambios significativos en el balance de N y en la EM, aunque reduce la energía digestible de la ración y la excretada en forma de CH₄. Además, el efecto de la sustitución del 35% del concentrado, en la dieta de cabras en lactación, por bloques multinutrientes sobre la digestibilidad de nutrientes, excreción de N en orina y de CH₄, indican lo adecuado de este nivel de sustitución para su uso en condiciones prácticas en sistemas de producción lechera, suponiendo también una reducción importante del impacto medioambiental de los sistemas de producción caprinos.

5.2.2. Fermentación ruminal y síntesis de proteína microbiana

En la **Tabla. 4.3** del capítulo de resultados se resumen los resultados obtenidos en los **experimentos 2 y 3**, en relación a la fermentación ruminal, flujo de nitrógeno microbiano y la eficiencia de síntesis en el rumen. El pH del rumen refleja la producción y absorción de los ácidos procedentes de la fermentación microbiana así como la capacidad tamponadora de la saliva que llega al rumen. Numerosos estudios, realizados *in vivo* e *in vitro*, han demostrado que el pH del rumen tiene un papel especialmente importante en la digestión de la fibra (Hungate, 1966; Mould et al., 1983; Mould y Ørskov, 1983). La actividad celulolítica se considera normal a valores de pH entre 6,5 y 7 pero disminuye cuando el pH es inferior a 6,3 (Stewart, 1977; Hiltner y Dehority, 1983; Mould et al., 1983). Ello se debe al descenso tanto de la actividad enzimática de las bacterias fibrolíticas (Terry et al., 1969; Stewart, 1977; Mould y Ørskov, 1983) como de la adhesión bacteriana a las paredes de las células vegetales (Roger et al., 1990). Los valores de pH encontrados en el presente trabajo se sitúan por encima del considerado como limitante de la actividad celulolítica (Pitt et al., 1996; de Veth y Kolver, 2001; Calsamiglia et al., 2002; Wales et al., 2004; Cerrato-Sánchez et al., 2007). Además, la sustitución parcial de concentrado por bloques multinutrientes no produjo cambios significativos en el pH. Este hecho contradice los resultados obtenidos por otros autores, que han observado una reducción del pH en el rumen cuando la cantidad de concentrado en la dieta aumenta (Hadjipanayiotou y Antoniou, 1983; Beever et al., 1989; Johnson y Johnson, 1995; Archimède et al., 1996; Cerrillo et al., 1999; Krause et al., 2002; Beauchemin et al., 2003; Tripathi et al., 2007; Wang et al., 2009). La ausencia de cambios en el pH al aumentar el concentrado en la dieta (Andrade y Schmidely, 2006; Tripathi et al., 2007; Zebeli et al., 2008) podría deberse al tipo de carbohidratos presentes en el concentrado (Ørskov y Fraser, 1975; Mould et al., 1983) y a la capacidad tamponadora que el heno de alfalfa puede ejercer (Dixon y Stockdale, 1999). Además, es posible que la cantidad de concentrado que se sustituyó por bloques no sea suficiente para promover cambios significativos en el pH con las distintas dietas. El caprino, por otro lado, posee una gran capacidad tamponadora específica (Silanikove, 2000) para evitar que el pH disminuya hasta valores que depriman la actividad celulolítica.

La concentración de N-amoniaco en el contenido ruminal depende de factores muy diversos, tales como el volumen del contenido ruminal, la actividad proteolítica, el reciclado de urea a través de la saliva, el ritmo de absorción o de utilización de los productos de fermentación, dependiente del pH, la disponibilidad y sincronización entre la disponibilidad

Capítulo 5

de la energía y el nitrógeno (Masson, 1989; Bach et al., 2005), etc. Por todo ello, los valores puntuales deben analizarse conjuntamente con otros parámetros de la fermentación y de la degradación ruminal y no de forma aislada. Los péptidos y aminoácidos (AA) resultantes de la actividad proteolítica de los microorganismos son transportados al interior de las células microbianas degradándose por la acción de peptidasas para dar lugar a AA. Estos pueden incorporarse a la proteína microbiana o bien desaminarse, dando lugar a AGVs, CO₂ y amoníaco (Tamminga, 1979). El destino de los péptidos y aminoácidos dependerá de la disponibilidad de energía en el rumen (Bach et al., 2005). Si existe energía disponible, los AA se transaminan y se utilizan directamente para la síntesis de proteína microbiana; si la energía es limitante, los AA se desaminan y, sus esqueletos carbonados fermentarán produciendo AGVs para generar la energía requerida. La concentración de N-amoniaco mínima para asegurar un crecimiento microbiano óptimo es variable, habiéndose establecido en 2,5 mg/dl (Owen y Bergen, 1983), 5 mg/dl (Satter y Slyter, 1974) o entre 3,3 y 8,5 mg/dl (Kang-Meznarich y Broderick, 1981). Los valores encontrados en los ensayos *in vivo* del presente trabajo estaban por encima de esas cifras, aunque en el rumen de cabras en lactación, alimentadas con dietas que incluían bloques con tomate y pepino, los valores eran menores que para las dietas AC y ACB. Este hecho, coincide también con la menor excreción de N en orina, todo ello posiblemente relacionado con la composición química y disponibilidad de los nutrientes de los destríos incorporados en los bloques de las dietas ACT y ACC. Los valores más elevados, observados en animales en lactación alimentados con las dietas AC y ACB, en comparación con las dietas ACT y ACC, podrían atribuirse a: *i*) una mayor disponibilidad de nitrógeno degradable en el caso de las dietas AC y ACB, y *ii*) una mayor utilización de ese nitrógeno para la síntesis de la proteína microbiana en el de las dietas ACT y ACC (Hoover, 1978; Bach et al., 2005). Sin embargo, la dieta ACT promovió un menor flujo de N microbiano y una menor eficiencia de síntesis de la proteína microbiana por lo que no parece que, con esta dieta, sea cierta la segunda de razón mencionada. Por el contrario, la dieta con bloques de pepino parece promover una mejor sincronización entre la energía liberada, en forma de ATP, por la fermentación de carbohidratos y la del nitrógeno aminoacídico y amoniaco disponibles para la síntesis de proteína por los microorganismos ruminales (Ben Salem y Nefzaoui, 2003; Bach et al., 2005). Algunos trabajos han demostrado la baja disponibilidad de la proteína, tanto del fruto como de subproductos del tomate (Fondevila et al., 1994; Ventura et al., 2009), que explicaría la menor eficiencia y extensión de la síntesis de proteína microbiana, observada en cabras alimentadas con la dieta ACT. En este sentido, Ørskov (1982) y Balcells et al. (1993) señalan que la concentración de N-amoniaco,

necesaria para la máxima eficiencia de la actividad microbiana no es la misma que la que permite un ritmo de fermentación óptimo. Así, la concentración mínima necesaria para que se produzca una digestibilidad máxima, es inferior a la requerida para promover la máxima síntesis de nitrógeno microbiano. No obstante, si se comparan las concentraciones de N amoniacal, encontradas en el rumen de las cabras alimentadas con las distintas dietas en los **experimentos 2 y 3**, con sus respectivos valores de digestibilidad de nutrientes y concentración de AGVs totales, la información es contradictoria como también ocurre en otros trabajos. En algunos casos, la concentración de N amoniacal aumentó al hacerlo la cantidad de concentrado en la dieta (Moss y Givens, 2002; Das y Ghosh, 2007), mientras que en otros no lo hizo (Hadjipanayiotou y Antoniou, 1983) o incluso disminuyó (Molina-Alcaide et al., 1997; Yáñez-Ruiz et al., 2004a). Además, se ha observado que este parámetro está influenciado por el tipo de forraje (Keady y Mayne, 2001).

La concentración de AGVs en el líquido ruminal refleja, fundamentalmente, la actividad fermentativa de los microorganismos sobre los hidratos de carbono aunque conviene considerar algunos aspectos importantes. Por una parte, la concentración de AGVs en el rumen, en un determinado momento, refleja el balance entre su producción y su salida del rumen, por absorción a través de las paredes de este compartimento digestivo (France y Siddons, 1993). Inmediatamente después de la ingestión del alimento, la producción de AGVs se dispara, aumentando su concentración en el rumen. Por otra parte, la concentración de AGVs no refleja la cantidad total de los mismos, presente en el rumen en ese momento, ya que esa cantidad total depende del volumen del contenido ruminal. Los AGVs representan aproximadamente un 60-70% del aporte de energía en los rumiantes (Van Soest, 1982; Armentano et al., 1992) y su producción es proporcional a la cantidad de MO que se degrada en el rumen (INRA, 1988). Si la disponibilidad de N es adecuada, la energía liberada durante la fermentación de los carbohidratos para formar AGVs repercutirá positivamente en la cantidad de masa microbiana producida en el rumen (Ørskov et al., 1968), tanto más cuanto mejor sincronización exista entre la liberación de energía y de N. Tal es el caso de los animales, tanto en mantenimiento como en lactación, que se alimentaron con la dieta ACC, que presentaron la mayor síntesis de N microbiano y concentración de AGVs, en comparación con las demás dietas. La producción de AGVs depende tanto de la *naturaleza de la dieta* (Van Soest, 1982) como del *patrón de alimentación* del animal (Czerkawski, 1986). De hecho, parece que la combinación del efecto bloque, que modifica el *patrón de alimentación*, permitiendo un aporte fraccionado y sincronizado de nutrientes al animal, y la

Capítulo 5

naturaleza de la dieta (en este caso la que incluía destríos de pepino) determina la fermentación y la síntesis de proteína microbiana. La concentración de AGVs no mostró el mismo rango de valores en cabras en mantenimiento y en lactación, lo cual era esperable ya que las ingestas de cada una de las dietas eran diferentes dependiendo del estado fisiológico de los animales experimentales. En cabras en mantenimiento los valores (66,9-82,2 mmol/L) eran similares a los encontrados por otros autores en el rumen de cabras de la raza Saanen, alimentadas con dietas a base de heno de alfalfa (Fujita et al., 2006) y superiores a los encontrados por Molina-Alcaide et al. (2009) en cabras que consumían dietas con bloques de alperujo. En las cabras en lactación los valores (85,6-161 mmol/L), eran mayores que el encontrado en cabras de raza Murciano-Granadina alimentadas con dietas basadas en heno de alfalfa (Molina-Alcaide et al., 2000). Por otro lado, se observa que la concentración de AGVs en el rumen aumenta cuando el concentrado se sustituye por bloques de tomate y pepino, en cabras no productivas, y se mantiene (dieta ACC) o disminuye ligeramente (dieta ACT) en cabras en lactación. Esto sugiere un mayor grado de fermentación de los carbohidratos de las dietas ACT y ACC, en el rumen de cabras no productivas, y similar en las que se encontraban en lactación. Los resultados observados en cabras en lactación coinciden con los observados por algunos autores, que utilizaron distintas proporciones de concentrado en las dietas de cabras en lactación (Andrade y Schmidely, 2006). Por otro lado, la falta de relación entre los valores de pH y las concentraciones de AGVs en el rumen es controvertida aunque podría deberse tanto al tipo de carbohidratos presentes en el concentrado (Ørskov y Fraser, 1975; Mould et al., 1983) como al nivel de sustitución del mismo, el efecto tamponador del heno de alfalfa (Dixon y Stockdale, 1999) o la capacidad tamponadora de la saliva de caprino (Silanikove, 2000). Sin embargo, con frecuencia se describe un efecto positivo del nivel del concentrado en la dieta sobre la concentración de AGVs en rumen (Owens et al., 2008) como consecuencia, probablemente, de una mayor degradación ruminal de este tipo de alimentos, en comparación con los forrajes. La controversia existente acerca del efecto de la cantidad de concentrado en la dieta sobre la degradabilidad del alimento y la concentración de AGVs en rumen se debe, principalmente, a los efectos asociativos o de interacción entre concentrados y forrajes, responsables de que la ingesta de energía digestible en dietas mixtas forraje-concentrado sea mayor o menor que la esperada cuando se consideran sus componentes por separado (Dixon y Stockdale, 1999). Los efectos positivos de esta interacción se manifiestan cuando un forraje, que contiene una baja concentración de un nutriente limitante para el crecimiento de los microorganismos del rumen, se combina con concentrados que tienen una alta proporción de dicho nutriente. Por el contrario, los efectos negativos de la interacción

suelen explicarse por una disminución del pH y, probablemente, por un efecto del contenido en almidón del concentrado (Mould et al., 1983; Mould y Ørskov, 1983), que se traducen en una menor ingesta/digestión de la dieta consumida. Entre estos dos extremos existe una amplia variedad de respuestas que dependen, en último término, de la cantidad (NRC, 2001) y calidad (Verité y Dulphy, 1981; Archimède et al., 1996) del concentrado añadido así como del tipo de forraje considerado (INRA, 1988).

Las proporciones molares de AGVs individuales, encontradas en el rumen de los animales, tanto en mantenimiento como en lactación, varían con la dieta, coincidiendo con observaciones derivadas de trabajos en los que se han estudiado los efectos de distintas cantidades de concentrado en la dieta de rumiantes (Russell, 1989; Khalili et al., 2000; Yáñez-Ruíz et al., 2004b; Lascano y Heinrichs, 2009). Estas variaciones no siguieron el mismo patrón en animales productivos que en los no productivos. La sustitución de concentrado por bloques multinutrientes redujo las proporciones molares de acetato en cabras en lactación y aumento las de acetato y propionato reduciéndose las de butirato en cabras en mantenimiento. Todo esto se traduce, además, en un patrón distinto de la relación acetato:propionato con las dietas experimentales en animales productivos y en mantenimiento, que trataremos de relacionar posteriormente con las emisiones de metano encontradas. Sin embargo, nuestras observaciones no coinciden con las bases establecidas por el INRA (1988) según las cuales dietas ricas en forraje dan lugar a proporciones elevadas de acetato y aquellas otras ricas en concentrado promueven un incremento de la proporción de propionato (INRA, 1988). Posiblemente esta discrepancia sea una consecuencia del *patrón de alimentación* y la *naturaleza de las dietas* empleadas en nuestros experimentos, que han permitido un aporte fraccionado y sincronizado de nutrientes a lo largo del día, gracias a la incorporación de los bloques. Los resultados encontrados en los **experimentos 1 y 2** coinciden con los observados por Giger et al. (1987, 1988) quienes encontraron un aumento en la proporción molar de butirato en ganado caprino al suplementar heno de alfalfa con granos de cereales. De hecho, Getachew et al. (2004) demostraron, *in vitro*, una relación positiva entre la concentración de carbohidratos no estructurales en la dieta y la síntesis de butirato, como se ha observado en el presente trabajo, ya que la sustitución de concentrado por bloque redujo las proporciones molares butirato, posiblemente también como consecuencia de una reducción de la actividad y/o crecimiento de bacterias productoras de butirato en el rumen (Carro y Ranilla, 2003). Algunos AGVs, como isobutírico e isovalérico, son factores necesarios para el crecimiento de los microorganismos requiriéndose en pequeñas cantidades para el crecimiento de

Capítulo 5

bacterias celulíticas, como *Ruminococcus albus*, *Ruminococcus flavefaciens* y *Bacteroides succinogenes* (Bryant, 1973; Allison, 1980; Wallace y Cotta, 1988). Las concentraciones de los ácidos isobutírico e isovalérico en el líquido ruminal, necesarias para que el crecimiento microbiano no se vea limitado, son respectivamente, de 0,3 y 0,9 mmol/l (Hume, 1970). La formación de AGVs a partir de proteína degradada es de especial relevancia ya que la producción de isobutírico se realiza a partir de la valina, y la del isovalérico a partir de leucina (Hardwood y Canale Parola, 1981; Vlaeminck et al., 2006). De hecho, la fermentación de esos aminoácidos podría verse comprometida en aquellos animales cuyas proporciones molares de isobutírico e isovalérico fueron más bajas, como ocurrió en cabras en mantenimiento alimentadas con la dieta que incluía el bloque de cebada y en cabras en lactación que recibían las dietas AC y ACC. Además, la baja producción de AGVs observada en cabras, productivas o no, que consumían la dieta con el bloque de cebada puede justificarse por un déficit en esos factores de crecimiento, que limitaría el desarrollo de la comunidad microbiana fibrolítica.

En relación a la síntesis de proteína microbiana, la fracción bacteriana, más comúnmente empleada para su estimación, es la que se aísla a partir del componente líquido del contenido ruminal. Sin embargo, en este trabajo se ha optado por utilizar un pellet de bacterias totales, que incluye las asociadas a sólido y a líquido, aislado a partir del contenido ruminal de los animales utilizados en el **experimento 2**. Zinn y Owens (1986) propusieron el uso de las bases púricas como marcador microbiano para la estimación de la síntesis de proteína microbiana en el rumen. Estos autores, al igual que los que han propuesto ecuaciones de predicción del flujo de nitrógeno microbiano (**FNM**) *in vivo* a partir de la excreción urinaria de DP (Chen et al., 1992; Belenguer et al., 2002; Mota et al., 2008), utilizan un valor constante de la relación BP/N en la fracción bacteriana aislada. Mediante ensayos dosis – respuesta se ha encontrado una elevada correlación entre la cantidad de purinas infundidas en duodeno y la de DP excretados en orina en bovino (Verbic et al., 1990; Vagnoni et al., 1997; Orellana-Boero et al., 2001; González-Ronquillo et al., 2003), ovino (Chen et al., 1990; Balcells et al., 1991) y caprino (Belenguer et al., 2002; Mota et al., 2008). Además, se ha demostrado que la excreción de DP en orina tiene una estrecha relación con el flujo de BP al duodeno y, por tanto, con la síntesis de proteína microbiana que tiene lugar en el rumen (Pérez et al., 1996; Martín-Orúe et al., 2000). Este indicador se ha utilizado (Ben Salem y Znaidi, 2008; Cantalapiedra-Hijar et al., 2009; Molina-Alcaide et al., 2009; Wang et al., 2009) para comparar el efecto que tienen distintos tratamientos sobre la síntesis de proteína

microbiana. Tanto la fracción bacteriana, como su relación BP/N, utilizadas para convertir el flujo duodenal de BP en flujo de N microbiano, parecen determinantes para la interpretación de los resultados (Tas y Susenbeth, 2007; Cantalapiedra-Hijar et al., 2009; Molina-Alcaide et al., 2009). La relación BP/N, utilizada en nuestros ensayos, fue menor que el valor empleado por Belenguer et al. (2002) en cabras alimentadas con heno de alfalfa a nivel de mantenimiento ($1,92 \mu\text{mol} / \text{mg}$) y que el utilizado por Chen et al. (1992) en ovejas ($1,66 \mu\text{mol} / \text{mg}$), aunque estuvieron en la línea de los encontrados por Molina-Alcaide et al. (2009, 2010a,b) en bacterias asociadas a sólido y líquido en el rumen. Obispo y Dehority (1999) sugirieron que los pellets bacterianos completos pueden estar contaminados con partículas de alimento, que contiene proteína, produciéndose una sobrestimación del FNM como consecuencia de los bajos cocientes BP/N encontrados en dichos pellets. Es probable que la diferente composición o estructura de las comunidades bacterianas ruminales, encontradas en el presente trabajo, sea responsable de algunas de las diferencias observadas en el perfil de AGVs, la relación BP/N de las fracciones bacterianas aisladas y el FNM estimado, ya que tanto el tipo de productos resultantes de la fermentación ruminal (Russell y Wallace, 1988; en Hobson the rumen microbiol ecosystem) como la concentración de purinas (Obispo y Dehority, 1999) difieren según el tipo de especies bacterianas consideradas. Sin embargo, esto no impidió que otros parámetros de la fermentación ruminal estudiados se comportaran de forma similar con las distintas dietas suministradas, probablemente debido a que las comunidades bacterianas fueron igualmente diversas y funcionales. Por otro lado, tanto en cabras productivas como no productivas, el flujo de N microbiano no respondió a los tratamientos de la misma forma que la excreción de DP en orina, en contra de las observaciones realizadas por otros autores (Pérez et al., 1996; Martín-Orúe et al., 2000; González-Ronquillo et al., 2003; Moorby et al., 2006). En algunos estudios (Valadares et al., 1999; Devant et al., 2000, 2001) se ha optado por aplicar un valor medio del cociente BP/N, obtenido en las fracciones bacterianas aisladas en sus condiciones experimentales, para tratar de paliar la variabilidad asociada a los efectos del animal y de la dieta en el cálculo de dicho parámetro. Aquellos estudios en los que se han seguido las ecuaciones mencionadas anteriormente, sin aislar fracciones bacterianas, y, por tanto, han utilizado el valor constante propuesto por el modelo, han obtenido la misma tendencia en la excreción urinaria de DP y en el flujo de N microbiano (Carro et al., 2000; Santoso et al., 2006; Giraldo et al., 2008).

Sólo se han llevado a cabo dos estudios de modelización de la excreción de DP en ovejas (Balcells et al., 1991; Chen et al., 1992) y otros dos en cabras, con animales en

Capítulo 5

mantenimiento (Belenguer et al., 2002) y en lactación (Mota et al., 2008) en los que sólo se usaron 3 y 5 animales, respectivamente, lo que denota la necesidad de usar un pellet bacteriano representativo de cada animal y dieta (Chen y Ørskov, 2004). Por ello, en el presente trabajo, se ha estimado el FNM con los modelos referidos para cabras (Belenguer et al., 2002; Mota et al., 2008) y se ha utilizado el valor BP/N correspondiente a las bacterias aisladas en el rumen de los animales experimentales alimentados con cada una de las dietas.

Las diferencias encontradas en la excreción de DP entre cabras en mantenimiento y en lactación parecen estar estrechamente relacionadas con la cantidad de N ingerido. Además, parece existir consenso acerca de la relación existente entre la cantidad de MO digestible ingerida por los rumiantes y la excreción urinaria de DP (Chen et al., 1992; Balcells et al., 1993; Pérez et al., 1998; Fujihara et al., 2005). Esa relación se ha observado en el presente trabajo, al contrario de lo observado por algunos autores (Chen et al., 1992; Fujihara et al., 2005). Ben Salem y Znaidi (2008) observaron que la sustitución de una parte del concentrado (33,7 g/Kg^{0,75}) por bloques, que incorporaban subproductos del olivar, incrementó tanto la ingesta de proteína digestible como la excreción de alantoína, a pesar de que la ingesta de MO digestible disminuyó significativamente. Tampoco, Kaur et al. (2008) encontraron, en ganado ovino, una relación entre la cantidad de MO digestible consumida por los animales y la excreción de alantoína en orina, al aumentar la proporción de concentrado en dietas isonitrogenadas. Esto subraya el importante papel que juega la disponibilidad de N en el crecimiento microbiano cuando la energía no es limitante. En el sistema francés de valoración de alimentos para rumiantes se describe bien esta situación mediante el concepto de proteína digestible en el intestino (PDI), de forma que cada alimento puede, en teoría, aportar dos cantidades diferentes de N en forma de AA absorbibles en intestino según exista en la dieta un déficit de energía (PDIE) ó de nitrógeno (PDIN).

Para dietas mixtas, que incluyen más de un 50% de forraje, se ha estimado en ovino que la producción media de N microbiano/kg MO aparentemente digerida en rumen, es de 32 y en 27 g cuando el forraje se encuentra en mayor proporción (ARC, 1984). Estas eficiencias se han estimado utilizando diferentes marcadores y representan un valor medio de los obtenidos en animales alimentados con dietas estandarizadas y basadas en alimentos convencionales. En ningún caso, se refieren a subproductos u otras fuentes de nutrientes no convencionales. Por ello, la comparación con nuestros resultados debe realizarse con cautela. En los experimentos del presente trabajo la eficiencia de síntesis de la proteína microbiana, expresada en esas unidades, se aproximaba a los valores propuestos por el ARC, aunque en cabras en lactación

fueron especialmente bajos con la dieta que incluía el bloque de tomate (21,1 g / kg OMAFR). Parece que el hecho de haber utilizado un pellet bacteriano completo o mixto, en nuestros ensayos *in vivo* para estimar la eficiencia y síntesis de proteína microbiana, no dio lugar a ningún tipo de sobreestimación, en contra de lo establecido por Obispo y Dehority, (1999).

En resumen, las diferencias encontradas en el patrón de fermentación promovido por las distintas dietas en animales no productivos y productivos podrían deberse a los respectivos niveles de sustitución del concentrado empleados y al estado fisiológico de los animales. La sustitución parcial de concentrado por bloques, que contenían destríos de tomate y pepino, redujo las emisiones de CH₄ sin modificar negativamente la concentración total de AGVs, aunque esta fue algo más baja en cabras en lactación alimentadas con bloques de tomate. Además, la fermentación promovida por las dietas que incluían los bloques con destríos era muy superior a la de las dietas que incluían los bloques de cebada, quedando patente el potencial que tienen los destríos para sustituir determinadas cantidades de cereales en las dietas de rumiantes. Aunque existen numerosos trabajos que han evaluado la utilización de subproductos en rumiantes (Gasa et al., 1989; Fondevila et al., 1994; Weiss et al., 1997; Belewu y Ademilola, 2002; Bueno et al., 2002; El Hag et al., 2002; Ben Salem, 2003, 2010; Yañez et al., 2004a y b; Olfaz et al., 2005; Denek y Can, 2006; Pirmohammadi et al., 2006; Fazlollah-Ghoreishi et al., 2007; Ben Salem y Znaidi 2008; Molina-Alcaide et al., 2009, 2010a; Ventura et al., 2009; Ben Salem y Makkar, 2010; Abbeddou et al., 2011a, b; Greenwood et al., 2012), no todos usan la misma estrategia para su incorporación observándose, por ello, diferencias entre trabajos que usan el mismo tipo de subproducto. La ventaja de usar bloques multinutrientes es múltiple ya que permiten la incorporación de subproductos o destríos con un alto grado de humedad a la dieta del rumiante y la conservación de esos desechos; además permiten aumentar el valor nutritivo de alimentos de calidad media-baja, como consecuencia del aporte sincronizado y balanceado de nutrientes que se consigue. A pesar de lo indicado por otros autores, nuestros resultados en cuanto a la digestibilidad de nutrientes como al balance energético y nitrogenado o la fermentación ruminal, apuntan a una mejora del valor nutritivo del destrío de tomate cuando se incluye en la dieta formando parte de un bloque multinutriente. La falta de trabajos con respecto al valor nutritivo del pepino en rumiantes limita las comparaciones que pudieran establecerse.

Capítulo 5

En general, la sustitución parcial del concentrado por bloques de destríos de tomate y pepino procedentes de su cultivo en invernadero, en dietas para caprino, no tuvo efectos negativos sobre los parámetros de la fermentación ruminal. La inclusión de bloques de pepino promovió los mayores valores de FNM y ESNM, mientras que la formulación del bloque de tomate debería mejorarse para optimizar el flujo de N microbiano y la eficiencia de síntesis en el rumen. Variaciones en los valores del cociente BP/N de las bacterias aisladas determinan que el FNM no presente un patrón de respuesta a los tratamientos similar al de la excreción urinaria de DP.

5.2.3. Producción de metano y abundancia de bacterias y arqueas

Se están llevando a cabo en todo el mundo numerosos estudios para tratar de reducir las emisiones de metano procedentes del ganado, mediante distintas estrategias y tecnologías (Moe y Tyrrel, 1979; McCrabb et al., 1997; Moss et al., 2000; Mohammed et al., 2004a, b; Steinfeld et al., 2006; Wallace et al., 2006; Grainger et al., 2007; Wright et al., 2007; Beauchemin et al., 2008; Sundset et al., 2009; Hook et al., 2009, 2010; Janssen, 2010; Abecia et al., 2012). Las pérdidas de energía en forma de metano en rumiantes representan 2-15% de la energía consumida por el animal, en función del tipo de dieta suministrada (Johnson y Johnson, 1995; Martín et al., 2010), siendo estas especialmente elevadas en animales de alta producción lechera (Taminga et al., 2007). Por ello, la reducción de las emisiones de metano en rumiantes, además de contribuir a disminuir el impacto medioambiental de la producción animal, puede traducirse en un beneficio económico directo, aumentando la eficiencia de utilización de la energía de la dieta por parte del animal.

La utilización de aditivos químicos (Abecia et al., 2012), compuestos vegetales secundarios y bioactivos (Ben Salem et al., 2005; Jouany et al., 2008), aceites esenciales (Calsamiglia et al., 2007), dietas ricas en ácidos grasos insaturados (Martín et al., 2010), modificaciones en el manejo, la suplementación de dietas basadas en forrajes y pobres en nutrientes (Martín et al., 2010) u otras para tratar de disminuir la producción de metano en rumiantes forma parte de numerosos estudios en la actualidad. Una de las modificaciones prácticas más estudiadas es el aumento de las proporciones de concentrado y carbohidratos rápidamente degradables en la dieta, que promueven una fermentación más rápida, dando lugar a una mayor producción de propionato, que actúa

como sumidero de electrones y, por tanto, reduce la síntesis de metano (Blaxter y Clapperton, 1965; Johnson y Johnson, 1995). Sin embargo, esta estrategia puede desencadenar una acidosis ruminal limitando, además, la capacidad del rumiante para aprovechar los forrajes y carbohidratos estructurales.

En general, el efecto antimetanogénico de las estrategias alimentarias puede deberse a distintos factores: *i*) la reducción de la fermentación de la MO en el rumen (Ben Salem y Makkar, 2010; Martin et al., 2010) aumentando la proporción de alimento que es fermentada en el intestino; *ii*) la reducción de la disponibilidad de H^+ para la síntesis de metano (Benchaar et al., 2001); *iii*) la inhibición de la actividad de las archaeas implicadas en la metanogénesis (Moss et al., 2000) y; *iv*) la optimización de la fermentación ruminal, reduciendo la cantidad de metano producida por unidad de MO digerida. No obstante, el éxito conseguido con estas estrategias es bastante limitado y, hasta el momento, sólo algunas manipulaciones de la dieta han mostrado efectos persistentes en el tiempo, sin afectar negativamente al funcionamiento del rumen (van Nevel y Demeyer, 2004; Calsamiglia et al., 2007; Patra y Saxena, 2009). En nuestros ensayos, parece que el efecto de las dietas sobre la producción de metano no fue igual en animales en mantenimiento y productivos. Las emisiones de metano se redujeron aproximadamente un 37% con la dieta ACT, en cabras en mantenimiento, y de 39 y 29% en cabras en lactación, con las dietas que incluían bloques con destríos de invernadero y cebada, respectivamente, en comparación con la dieta testigo. En cabras en mantenimiento la inhibición de la metanogénesis se vio acompañada de un aumento de la concentración de AGVs totales y de la proporción molar de propionato así como por una reducción de la relación acetato:propionato, actuando por tanto el propionato como sumidero de electrones alternativo a la metanogénesis (Blaxter y Clapperton, 1965; Johnson y Johnson, 1995), en línea con los resultados obtenidos por Abecia et al. (2012) en cabras de raza Granadina a las que se había suministrado un aditivo antimetanogénico sintético. El efecto de sustituir el concentrado por bloques multinutrientes sobre las emisiones de metano en cabras en lactación parece más complejo ya que la reducción de metano promovida por las dietas que incluían bloques no supuso un aumento de las proporciones molares de propionato. Sin embargo, existen otras rutas metabólicas alternativas que pueden actuar como sumidero de electrones (Yu y Morrison, 2004). También parece existir un efecto bloque y un efecto del destrío incluido en el bloque sobre la metanogénesis. Así, las dietas ACT y ACB promovieron

Capítulo 5

una menor concentración de AGVs totales en el rumen, en comparación con las dietas AC y ACC. De hecho, la concentración de AGVs es proporcional a la cantidad de MO degradada en el rumen (INRA, 1988). Ello podría indicar que la cantidad de MO degradada en el rumen con las dietas ACT y ACB es menor y ocasionaría una menor fermentación ruminal y, por tanto, una menor producción de gas y de metano (Martin et al., 2010) y haría que las dietas se digiriesen en el intestino u otros tramos inferiores del aparato digestivo (Ben Salem y Makkar, 2010). Puesto que las dietas que incluyen bloques (ACT, ACC y ACB) se diferencian esencialmente en la fuente de carbohidratos era tomate, pepino o cebada grano, respectivamente, estos serían los responsables de las diferencias observadas. Parece que la disponibilidad de nutrientes en rumen es mayor con la dieta que contiene pepino, cuyo efecto antimetanogénico podría deberse a mecanismos distintos a los que actúan con las dietas ACT y ACB, como la reducción de la disponibilidad de H^+ para la síntesis de metano (Benchaar et al., 2001), la inhibición de la actividad de las archaeas implicadas en la metanogénesis (Moss et al., 2000) y la optimizando de la fermentación ruminal, reduciendo la cantidad de metano producida por unidad de MO digerida (Martín et al., 2010). La presencia de compuestos secundarios bioactivos del tipo de los taninos, abundantes en el pepino, pueden determinar, al menos en parte, su efecto antimetanogénico (Newbold et al., 2004; Patra y Saxena, 2010). Los diferentes resultados obtenidos con dietas que incluían tomate y pepino pueden responder a lo sugerencia de que el efecto antimetanogénico de los compuestos vegetales secundarios está relacionado, con su estructura y peso molecular así como con la composición de la dieta (Guo et al., 2008).

Trabajos previos del grupo (Abecia et al., 2012), realizados con cabras en lactación alimentadas con dietas basadas en heno de alfalfa, han observado que la adición de un compuesto sintético con un potente efecto antimetanogénico, el bromoclorometano, aumenta la producción de leche. La reducción en las emisiones de metano observadas en animales alimentados con dietas que incluían bloques con destríos de invernaderos, no se vio acompañada de un aumento de la producción de leche, lo que indica que la eficiencia de utilización de la energía de la dieta por el animal no se mejoró con la reducción del metano. Los resultados obtenidos en nuestros ensayos *in vivo*, demuestran el potencial de los bloques multinutrientes, que incluyen destríos de invernadero, como alternativa natural al uso de aditivos químicos, antibióticos u otras drogas

potencialmente peligrosas para el animal y el medioambiente (Wright et al., 2004; Denman et al., 2007; Abecia et al., 2012).

En los últimos años se han abordado numerosos estudios acerca de la diversidad microbiana del rumen usando técnicas moleculares, en vacas (Tajima et al., 1999, 2001; Wright et al., 2007), ciervos (Sundset et al., 2007, 2009), ovejas (Wright et al., 2004a, 2006; Yáñez et al., 2010), yak (Yang et al., 2010a) y búfalos (Yang et al., 2010b). Si embargo, son pocos los estudios que han profundizado en el estudio de arqueas en el rumen de cabras (Shi et al., 2008; Cheng et al., 2009; Abecia et al., 2011; Cunha et al., 2011; Gu et al., 2011). Este es el primer estudio en el que se ha utilizado técnicas de secuenciación de nueva generación, sin recurrir a clonación previa en vectores, para tratar de relacionar el efecto de la dieta sobre las emisiones de metano, abundancia y diversidad de arqueas metanogénicas en el rumen de cabra. Algunos autores han encontrado una correlación entre las emisiones de metano y la densidad de arqueas metanogénicas en el rumen (Sundset et al., 2009). Así, en ganado vacuno tratado con bromoclorometano, Denman et al. (2007) encontraron una reducción del 30% en las emisiones de metano, asociada a una reducción del 34% de la abundancia de arqueas, contrariamente a nuestras observaciones en animales en lactación y a las de otros autores (Nollet et al., 1998; Machmüller et al., 2003a, b; Yáñez-Ruiz et al., 2008). Parece que la diversidad y estructura de estas poblaciones, así como su expresión génica juegan un papel más importante en la metanogénesis que su abundancia (Morgavi et al., 2010; Zhou et al., 2010), aunque todavía no se conocen que géneros o especies están implicados en mayor medida en la producción de metano en el rumen (Yu y Morrison, 2004). De hecho, los resultados preliminares encontrados en los **experimentos 2 y 3**, parecen indicar que las variaciones encontradas en la diversidad de metanogénicas (*Methanobrevibacter*, *Methanomicrobium*, *Methanosphaera* y *Methanomicrococcus*) podrían asociarse con las distintas respuestas observadas en las emisiones de metano con las distintas dietas. Aunque no debemos olvidar que los géneros o especies menos abundantes podrían estar íntimamente relacionados con variaciones en la producción de metano (Wright et al., 2004b). Por otro lado, los resultados preliminares de secuenciación coinciden con observaciones previas de otros autores acerca de que el género *Methanobrevibacter* es el más abundante dentro de las arqueas metanogénicas presentes en el rumen (Whitford et al., 2001; Ouwerkerk et al., 2008; Wright et al., 2008, 2009). Además, el resto de géneros (*Methanomicrobium*, *Methanosphaera* y

Capítulo 5

Methanomicrococcus) también se encontraron dentro de las proporciones normales observadas en rumiantes (Kim et al., 2011).

Las abundancias de bacterias totales (11,2-11,5 log copias génicas / g materia fresca) y de arqueas metanogénicas (8,48-8,91 log copias génicas / g FM), se situaron en el mismo rango en cabras en mantenimiento y en lactación, que corresponde al rango fisiológico descrito en el rumen (Kumar et al., 2009). Sin embargo, los valores encontrados para bacterias totales (9,4-9,6 log copias génicas / g FM) en los ensayos *in vitro* (**experimento 1**) eran inferiores a los observados *in vivo*, posiblemente debido a la filtración del líquido ruminal, que se realiza para la preparación del inóculo y que hace que se pierdan parte de las bacterias asociadas a la fracción sólida. El consorcio microbiano adherido a las partículas sólidas presenta mayor biodiversidad (Tajima et al., 1999; Larue et al., 2005; Kong et al., 2010) y densidades poblacionales (Forsberg y Lam, 1977; Craig et al., 1987; Minato et al., 1993) que otros compartimentos ruminales. Por otro lado, la eficacia de cualquier procedimiento *in vitro* depende, en gran medida, de la rapidez con que se lleve a cabo, puesto que los microorganismos ruminales son sensibles al oxígeno. Las *arqueas* y los hongos del rumen son especialmente sensibles a una atmósfera oxidativa (Orpin y Joblin, 1997; Stewart et al., 1997). Por ello, la similitud de los resultados encontrados en las densidades de *Archaeas* metanogénicas entre los ensayos *in vivo* e *in vitro*, confirman las buenas prácticas durante la manipulación del inóculo en las incubaciones con CNRMR (**experimento 1**)

En general, la sustitución parcial del concentrado por bloques con destríos de tomate y pepino procedentes de su cultivo en invernadero tiene un gran potencial, sobre todo en animales productivos, como alternativa al uso de medicamentos y aditivos sintéticos para la reducción de las emisiones de metano en pequeños rumiantes. Por otro lado, parece que no existe correlación entre la síntesis de metano y las densidades de arqueas metanogénicas en el rumen, siendo posiblemente la diversidad, estructura y actividad de sus poblaciones las que jueguen un papel más importante que su abundancia en la metanogénesis.

5.2.4. Producción y composición de la leche

La leche constituye una fuente importante de energía, proteína de buena calidad, vitaminas, minerales y compuestos bioactivos (Boza y Sanz Sampelayo, 1997) para el consumidor. Por otro lado, la proteína de la leche de cabras es más digestible (Park,

1994; Boza y Sanz Sampelayo, 1997; Haenlein, 2001, 2004; López-Aliaga et al. 2003) y más tolerable (Bevilacqua et al., 2001; Lara-Villoslada et al., 2004; Sanz Ceballos, 2007) que la de la leche de vaca; la grasa de la leche de cabra también es más tolerable que la de la vaca (Alfárez et al., 2001; Haenlein, 2001; Boza and Sanz Sampelayo, 1997; Sanz Ceballos, 2007). En la actualidad se presta un especial interés al desarrollo de estrategias alimentarias que permitan modificar la composición de la leche de rumiantes para atender a las necesidades del consumidor y mejorar la calidad nutritiva y saludable de la leche (Craig-Schmidt, 2006; Shingfield et al., 2008; Siró et al., 2008). Cualquier cambio en la dieta de un animal en lactación puede promover cambios en la composición y producción de la leche por lo que hay que prestar especial atención a los efectos positivos y negativos derivados de la inclusión de fuentes de nutrientes no convencionales, como subproductos y desechos, en la dieta (Dung et al., 2005; Vasta et al., 2008). Los resultados de este trabajo no mostraron diferencias ni en la producción de leche, ni en la concentración de sus componentes, cuando el 35% del concentrado en la dieta de cabras lecheras se reemplazó por bloques que incluían tomate y pepino. Sólo se encontraron diferencias significativas en la producción y concentración de lactosa aunque el rango de valores, encontrados con las distintas dietas, era normal coincidiendo con los resultados obtenidos con vacas, en los que también se redujo el contenido en lactosa de la leche mediante manipulaciones de la dieta que implicaban un aumento de la relación forraje:concentrado (Gordon y Forbes, 1971; Sutton et al., 1980, 1985), o la suplementación con grasas (Dunkley et al., 1977; MacLeod et al., 1977; DePeters y Taylor, 1985), pero siempre dentro de los rangos fisiológicos (Sutton, 1989; Jenkins y McGuire, 2006). Sólo algunos estudios han evaluado, en pequeños rumiantes en lactación, los efectos de la utilización de subproductos agroindustriales, tales como el alperujo (Hadjipanayiotou, 1999; Cabiddu et al., 2004; Molina-Alcaide et al., 2010a), las pulpas de cítricos (Fegeros et al., 1995; Todaro et al., 2004; Volanis et al., 2004), el orujo de uva (Tsiplakou y Zervas, 2008), la pulpa de granada (Modaresi et al., 2011) y la pulpa de tomate (Weiss et al., 1997; Di Francia et al., 2004; Romano et al., 2010; Abbeddou et al., 2011). En ninguno de estos trabajos se ha observado un aumento en la cantidad de leche producida o de su concentración en proteína, ni disminuciones en su concentración en grasa. Sin embargo, otros autores han observado una disminución de la cantidad de leche producida en animales cuya dieta incluía subproductos (Cabiddu et al., 2004; Volanis et al., 2004; Molina-Alcaide et al., 2010a). Otros no han observado cambios (Fegeros et al., 1995; Weiss et al., 1997; Hadjipanayiotou, 1999; Di Francia et

Capítulo 5

al., 2004; Tsiplakou y Zervas, 2008; Romano et al., 2010; Abbeddou et al., 2011; Modaresi et al., 2011). Algunos de los efectos negativos observados se han considerado una consecuencia de la presencia de factores antinutricionales, como los taninos (Vasta et al., 2008) o de una incorrecta formulación de la dieta, que no permitiese cubrir las necesidades energéticas y nutricionales durante la lactación (Aguilera et al., 1990). No obstante, mientras algunos autores han observado una reducción de la producción de leche en rumiantes alimentados con dietas con un contenido en taninos medio-alto (Makkar, 2003; Min et al., 2003), otros han demostrado que una ingesta moderada de taninos puede tener efectos beneficiosos en la cantidad y calidad de la leche producida (Vasta et al., 2008). De hecho, Dung et al. (2005) observaron un aumento progresivo en la producción de leche en cabras alimentadas con dietas en las que se sustituyó progresivamente la paja de arroz por hojas de mandioca.

5.2.4.1. Proteína de la leche

Las fracciones nitrogenadas de la leche corresponden a 3 categorías: caseína, suero y nitrógeno no proteico (NNP). La caseína constituye la mayor parte de la proteína presente en la leche (80%), aportando el suero y el NNP el resto (15 y 5%, respectivamente; Jenkins y McGuire, 2006; Sanz Ceballos et al., 2009). En el proceso de elaboración del queso, tanto el rendimiento quesero como la estructura y firmeza del cuajo están íntimamente relacionados con el contenido en caseína de la leche utilizada (Jenkins y McGuire, 2006). Puesto que un gran porcentaje de la leche de cabra se destina a la producción de queso, la ausencia de diferencias observadas en el contenido en caseína de la leche de cabras alimentadas con dietas en la que el 35% del concentrado se sustituyó por bloques que incluían destríos de tomate o pepino representaría una ventaja de esta estrategia alimentaria.

La información acerca del efecto de la inclusión de subproductos sobre la composición de la leche es contradictoria, en lo que se refiere a la concentración de proteína en la leche, pudiéndose observar tanto una disminución (Cabiddu et al., 2004; Todaro et al., 2004; Volanis et al., 2004; Abbeddou et al., 2011), como una ausencia de cambios en la misma (Fegeros et al., 1995; Weiss et al., 1997; Hadjipanayiotou, 1999; Di Francia et al., 2004; Tsiplakou y Zervas, 2008; Molina-Alcaide et al., 2010a; Romano et al., 2010; Modaresi et al., 2011). Los factores ligados a la dieta, que pueden tener una mayor influencia sobre el contenido en proteína de la leche, son *i*) la relación

forraje:concentrado, *ii*) la cantidad y fuente de la proteína de la dieta y, *iii*) la cantidad y fuente de grasa dietética. Además, la producción de proteína en la leche depende, en gran medida, de la fracción de proteína de la dieta fácilmente degradable en el rumen y también, aunque en menor medida, de la fracción no degradada de la misma (Sanz Sampelayo et al., 1999). No obstante, las modificaciones de la dieta pueden provocar una respuesta distinta en el contenido y la producción de proteína en leche. Por ello, el principal reto es aumentar el contenido en proteína, manteniendo o incrementando la producción de leche (DePeters y Cant, 1992). La reducción de la cantidad de concentrado en la dieta se ha asociado con una disminución del contenido en proteína de la leche, como consecuencia de la menor cantidad de carbohidratos rápidamente degradables presentes en la dieta (Jenkins y McGuire, 2006). Sin embargo, la sustitución parcial de concentrado por bloques multinutrientes en cabras en lactación no dio lugar a tales cambios en la composición de la leche. Dado que las dietas se formularon como isoenergéticas e isonitrogenadas, los cambios causados por la incorporación de los destríos en la composición aminoacídica de la proteína de la dieta no fueron suficientes para afectar a la composición en proteína de la leche (Bequette et al., 1999). Además, aunque las ingestas de N y energía fueron ligeramente más bajas en las dietas que contenían bloques, la inclusión de destríos de invernaderos no afectó, de manera significativa, a los balances de N, en comparación con la dieta control. La información existente al respecto parece indicar que para conseguir pequeños cambios en el contenido en proteína de la leche se requieren grandes cambios en la cantidad y fuente de la proteína utilizada en la dieta (un aumento del 0,02% en el contenido de proteína en la leche por cada incremento del 1% en el contenido de proteína de la dieta; Roy Emery, 1978).

La leche tiene un reconocido valor como fuente natural de aminoácidos, como la carnitina y la taurina, y de péptidos bioactivos con propiedades antitrombóticas, antihipertensivas, y antimicrobianas (Park et al., 2007). De acuerdo con nuestras observaciones otros autores (Wang et al., 1996; Barry y McNabb, 1999) no han encontrado diferencias en la producción y composición de la leche de animales alimentados con dietas que contenían subproductos con bajas cantidades de taninos, aunque sí encontraron un incremento del flujo de proteína al abomaso y de la absorción de aminoácidos esenciales en el intestino. Sin embargo, en el presente trabajo se ha observado una tendencia ($P = 0,062$) hacia una menor concentración en aminoácidos

Capítulo 5

esenciales en la leche de cabras alimentadas con las dietas que incluían los bloques con tomate y cebada, en comparación con la dieta testigo. En el caso de los animales alimentados con bloques de tomate, este hecho pudo deberse a la menor disponibilidad de la proteína del tomate, ya descrita por otros autores (Fondevila et al., 1994; Ventura et al., 2009). Además, la leche de esas cabras tenía un menor porcentaje de N proteico, en relación al N retenido por el animal, indicando que su perfil aminoacídico distinto pudo influir en la retención y producción de proteína en la leche (Bequette et al., 1999). En la revisión realizada por Jenkins y McGuire en el año 2006, acerca de las estrategias desarrolladas en los últimos 25 años para modificar la composición de la leche en rumiantes, se destaca que la glándula mamaria tiene la capacidad de modificar la composición en proteína y aminoácidos de la leche, en función de la concentración en aminoácidos de la sangre, el flujo de sangre a la mama y su actividad metabólica. Al igual que ocurre con las fuentes tradicionales de proteínas, el éxito de la utilización de fuentes alternativas en la alimentación de pequeños rumiantes en lactación depende de la habilidad para formular dietas balanceadas en proteína degradable y aminoácidos esenciales (Vasta et al., 2008).

5.2.4.2. Grasa láctea

La grasa de la leche es el componente más sensible a las modificaciones que se realicen en la dieta del animal (Jenkins and McGuire, 2006). La respuesta de la fracción grasa de la leche de cabra depende, en gran medida, del estadio de lactación, siendo más acentuados los cambios en el último tercio de misma (Mir et al., 1999; Rapetti et al., 2002; Bernard et al., 2005), lo que coincide con el estadio de lactación en que se encontraban los animales utilizados en el **experimento 3**. La cantidad mínima de grasa en la dieta de cabras lecheras se ha estimado en 1 g/kg PV (Morand-Fehr y Sauvant, 1980) habiéndose observado que cantidades inferiores reducen la producción de leche y su contenido en grasa (Bender y Maynard, 1932; Delage y Morand-Fehr, 1967). Los trabajos que han estudiado los efectos de la inclusión de subproductos sobre la composición de la leche difieren también en cuanto a su efecto sobre la concentración de grasa en la leche, pudiéndose observar tanto un aumento (Hadjipanayiotou, 1999; Volanis et al., 2004; Modaresi et al., 2011), como ausencia de cambios (Fegeros et al., 1995; Weiss et al., 1997; Di Francia et al., 2004; Todaro et al., 2004; Tsiplakou y Zervas, 2008; Molina-Alcaide et al., 2010a; Romano et al., 2010; Abbeddou et al., 2011). Como se ha mencionado anteriormente, las diferencias observadas entre los

distintos trabajos están sujetas a numerosos factores, ligados tanto al animal como a la dieta utilizada.

Durante los últimos 20 años la atención de los investigadores en el área se ha centrado en aquellos ácidos grasos con posibles efectos sobre la salud humana, fundamentalmente ácidos grasos saturados, *omega 3*, ruménico (CLA) y *trans* (Lawson et al., 2001; Pariza et al., 2001; Simopoulos, 2002; Kühlsen et al., 2005; Collomb et al., 2006; Parodi, 2009). El papel de la grasa de la leche en la salud del consumidor puede ser objeto de controversia (Elwood et al., 2008; Lock et al., 2008). De hecho, y a pesar de la presencia de lípidos con carácter beneficioso para la salud, todavía algunos profesionales en nutrición humana sólo consideran la importante contribución de la leche a la ingesta diaria de ácidos grasos saturados, con efectos no saludables (WHO, 2003). Los lípidos que contienen los alimentos que recibe el rumiante experimentan importantes transformaciones en el rumen por los procesos de lipólisis y biohidrogenación. La composición en ácidos grasos de la leche de los rumiantes depende de una serie de factores (Lock and Bauman, 2004; Dewhurst et al., 2006; Pulina et al., 2006; Chilliard et al., 2007; Sanz Sampelayo et al., 2007), relacionados con el animal (especie, raza, genotipo y estado fisiológico) o no (manejo, ambiente, alimentación). Los ácidos grasos más abundantes en la leche de las cabras utilizadas en este trabajo fueron palmítico, oleico, cáprico, mirístico, esteárico y laurico, en línea con los resultados observados por Sanz Sampelayo et al. (2000) también en cabras de raza Murciano-Granadina. Numerosos estudios han demostrado la posibilidad de modificar la composición del perfil en ácidos grasos de la leche, mediante cambios en la dieta (Chouinard et al., 2001; Lock and Bauman, 2004; Pulina et al., 2006; Chilliard et al., 2000, 2007), aunque sólo algunos se han llevado a cabo en cabras (Bouattour et al., 2008; Luna et al., 2008; Bernard et al., 2009). Se ha especulado sobre si la inclusión de subproductos agroindustriales en la dieta del rumiante podría modificar el perfil en ácidos grasos de la leche pero, sólo algunos trabajos recientes examinan sus efectos en este sentido, habiéndose evaluado subproductos procedentes del cultivo y la industria del olivar, de la elaboración del vino, tomate y granada (Chiofalo et al., 2004; Tsiplakou y Zervas, 2008; Molina-Alcaide et al., 2010a; Romano et al., 2010; Abbeddou, et al., 2011; Modaresi et al., 2011). El efecto de subproductos de la industria del tomate se ha estudiado sólo en ovejas (Romano et al., 2010; Abbeddou et al., 2011) observándose la misma tendencia que en las cabras alimentadas con bloques de destríos de tomate: un incremento en las concentraciones de LA, LNA, CLA y PUFA totales. También se observó una reducción en la concentración

Capítulo 5

de ácido esteárico, de aproximadamente 12%, en animales cuyas dietas contenían bloques de tomate y de cebada. Además, la mayor acumulación en la leche de cabras alimentadas con bloque de tomate en *cis*-9, *trans*-12 18:2 y *trans*-11, *cis*-15 18:2, ambos intermediarios del metabolismo del LNA, sugiere una biohidrogenación incompleta del LNA en el rumen de estos animales, consecuencia probablemente de cambios en la microbiota. Es posible que, durante la preparación de los bloques de tomate, parte de sus semillas se rompan dejando una fracción de ácidos grasos disponibles para ser biohidrogenados en el rumen, dando lugar a la acumulación de intermediarios de la biohidrogenación, mientras que la fracción que queda en las semillas completas se queda protegida, y puede absorberse a en el intestino delgado. Una disminución de la biohidrogenación promovería una reducción en el contenido en ácidos grasos saturados en leche y, en consecuencia, una mejora de su calidad saludable. Por otro lado, la mayor acumulación de LNA en la leche de cabras alimentadas con dietas que incluían bloques podría estar asociada con modificaciones en el ecosistema ruminal, provocadas por una menor disponibilidad de energía o por la presencia de compuestos vegetales secundarios en la dieta (Leiber et al., 2005; Vasta et al., 2008). En general, la sustitución de un 35% del concentrado por bloques que contienen destríos de invernadero aumentó la concentración en leche de LNA y PUFA totales (**Figura. 5.1**), dando lugar a un perfil en ácidos grasos más saludable (Pariza, 2004; Kromhout et al, 2010), reduciendo además la relación $\Sigma n6/\Sigma n3$, que es considerada de gran importancia para la salud humana (Simopoulos, 2002).

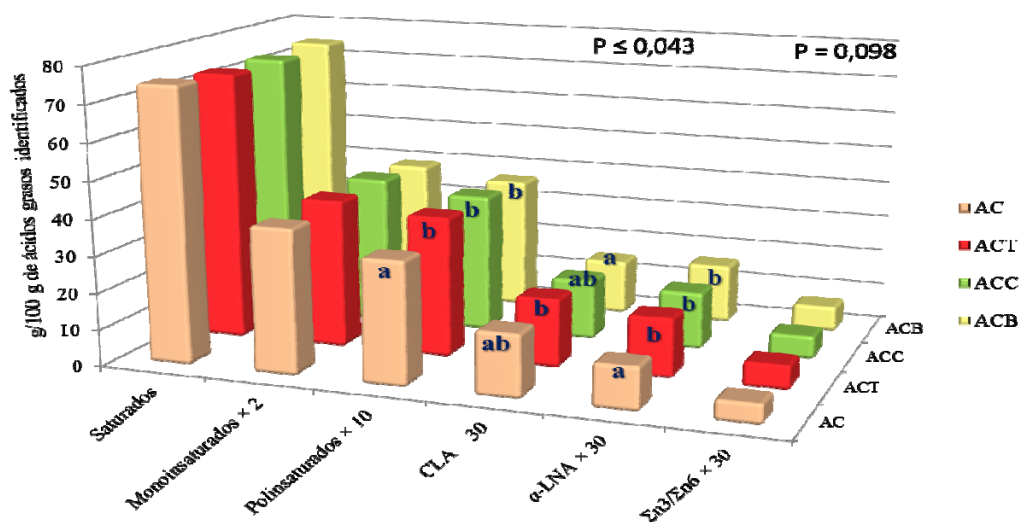


Figura 5.1. Composición en ácidos grasos (g/100 g de ácidos grasos identificados) de la leche de cabras alimentadas con las dietas experimentales.

La tasa de recuperación en leche (**Tabla 5.3**) de los ácidos linoleico, oleico y linolénico (LA, OA y LNA, respectivamente) fue mayor en cabras que consumían dietas con bloques multinutrientes que en las que recibían la dieta control. Nuestros resultados estuvieron en la línea de los encontrados por Khiaosa-Ard et al. (2010) y Abbeddou et al. (2011) quienes observaron una correlación negativa entre la ingesta de ácidos grasos y su tasa de recuperación en leche. Dado que el uso de bloques multinutrientes permite un aporte sincronizado y fraccionado de nutrientes al rumen (Ben Salem y Nefzaoui, 2003) esta estrategia alimentaria podría permitir una mejor absorción de ácidos grasos en el intestino delgado.

Tabla. 5.3. Ingesta y tasa de recuperación (g de FA excretados en leche /g de FA ingeridos) de ácidos grasos en cabras en lactación alimentadas con las dietas experimentales¹ (n = 8)

	Dieta				EEM	P-valor
	AC	ACT	ACC	ACB		
Ingesta FA (mg/d)						
alfa-LNA	2391 ^b	2249 ^a	2223 ^a	2245 ^a	63.9	0.034
<i>cis</i> -9, <i>cis</i> -12, 18:2	8968 ^c	6787 ^b	6298 ^a	6322 ^a	59.5	< 0.001
² <i>cis</i> -9 18:1	7955 ^c	5642 ^b	5395 ^a	5406 ^a	28.1	< 0.001
18:0	2451 ^c	1892 ^b	1809 ^a	1853 ^{ab}	25.8	< 0.001
Tasa de recuperación FA						
alfa-LNA	0.090 ^a	0.12 ^b	0.12 ^b	0.12 ^b	0.010	0.012
<i>cis</i> -9, <i>cis</i> -12, 18:2	0.13 ^a	0.17 ^b	0.19 ^b	0.17 ^b	0.013	0.021
² <i>cis</i> -9 18:1	1.16 ^a	1.48 ^b	1.64 ^b	1.50 ^b	0.095	0.012
18:0	1.57	1.63	1.82	1.68	0.180	0.698

¹AC = 1000 g heno de alfalfa y 1000 g concentrado; ACT = 1000 g heno de alfalfa, 650 g concentrado, y 231,5 ± 68,8 g bloque de tomate; ACC = 1000 g heno de alfalfa, 650 g concentrado, y 239 ± 58,9 g bloque de pepino; ACB = 1000 g heno de alfalfa, 650 g concentrado, y 223 ± 87,6 g bloque de cebada (en base a materia fresca). ² Contiene *trans*-12, *cis*-10+*trans*-15 18:1 como componentes menores.

En general, la sustitución del 35% de un concentrado a base de cereales en la dieta de cabras en lactación por bloques multinutrientes, que incluyen destríos de tomate y pepino procedentes de su cultivo en invernadero, no afecta a la producción de leche ni a la de sus componentes y mejora el perfil en ácidos grasos de su grasa haciéndola mas saludable. No obstante, la menor concentración en EAA en la leche de cabras alimentadas con la dieta ACT, sugiere considerar una mejora en la formulación de los bloques de tomate, sobre todo en cuanto a calidad y composición de los aminoácidos de su proteína.

Capítulo 6
Conclusiones

Conclusiones

Teniendo en cuenta los objetivos abordados y los resultados obtenidos se pueden establecer las siguientes conclusiones:

Primera

Es posible incluir destríos de tomate y pepino, procedentes de la horticultura en invernaderos, como componentes de bloques multinutrientes en la dieta de cabras, tanto en mantenimiento como en lactación. Los niveles óptimos de sustitución del concentrado por bloques, en la dieta de cabras en mantenimiento y en lactación, se han establecido en 50% y 35%, respectivamente. Estos niveles de sustitución del concentrado promueven descensos en el coste de las correspondientes raciones del 32 y 22%.

Segunda

Los bloques que incluyen destríos de tomate y pepino promueven un patrón de fermentación en el rumen mejor, una menor producción de metano, mayor abundancia de arqueas metanogénicas, con una diversidad diferente, en comparación con los bloques que incluyen cebada grano. El contenido en lactosa de la leche de las cabras que reciben bloques con cebada es mayor que en la de aquellos animales que reciben bloques con destríos de tomate y pepino.

Tercera

La sustitución parcial del concentrado por bloques que incluyen destríos de tomate y pepino en la dieta de caprino, tiene los siguientes efectos:

1. No modifica la energía metabolizable ni el balance de nitrógeno en animales en mantenimiento ni en lactación. El nitrógeno en orina se reduce en cabras en lactación, lo que tiene implicaciones ambientales importantes. Solo la dieta que contenía bloques de pepino aumenta el flujo de nitrógeno microbiano al duodeno y la eficiencia de síntesis de proteína microbiana.
2. Aumenta la concentración de ácidos grasos en el rumen de cabras en mantenimiento y no la modifica en animales en lactación. En ambos casos no modifica el pH. Reduce la concentración de amonio en el rumen de cabras en lactación.
3. Reduce las emisiones de metano en un 25% en animales en mantenimiento y un 39% en animales en lactación si bien el efecto no parece depender solo del tipo de destrío sino que existe un efecto bloque. Sólo en algunos casos la reducción de las emisiones de

Capítulo 6

metano se acompaña de un incremento en la proporción de propionato en rumen, lo que parece indicar la intervención de otras rutas metabólicas en el proceso. Tampoco modifica la densidad de bacterias totales, determinada por PCR cuantitativa, ni en animales en mantenimiento ni en lactación. La densidad de las arqueas metanogénicas aumenta en animales en mantenimiento y no se modifica en cabras en lactación. El análisis de secuencias de las arqueas metanogénicas, realizado en un pirosecuenciador 454, parece indicar un importante papel de la diversidad y estructura de las comunidades de este tipo de arqueas en la metanogénesis. Probablemente, los géneros o especies menos abundantes determinan en gran medida la producción de metano. Así, en cabras en mantenimiento, el género *Methanomicrobium* sólo aparece en el rumen de las que reciben bloques de tomate, y el género *Metanomicrococcus* aparece sólo en el rumen de animales alimentados con dietas que incluyen bloques de pepino.

4. No modifica ni la producción de leche ni la mayor parte de sus componentes aunque la dieta con bloques de tomate promovía contenidos menores en leche de aminoácidos esenciales y de lactosa. Aumenta las concentraciones de los ácidos linoleico (13%), linolenico (38%) y poliinsaturados totales (14%) y disminuye la de ácido esteárico (10%) en la leche, lo que la hace más saludable en comparación con la leche de animales que recibían la dieta control.

Conclusions

Based on the initial aims and the results obtained in this work, we can conclude:

First

It is possible to include tomato and cucumber wastes, from greenhouse horticulture, as ingredients of multinutrient feed blocks in non-productive and productive goat diets. The optimum substitution levels of concentrate with feed blocks were 50 and 35% in non-productive and productive goats, respectively. These substitution levels of concentrate promote a reduction in feeding cost of 32 and 22%, respectively.

Second

Feed blocks containing tomato and cucumber waste fruits promoted a better fermentation pattern, lower methane production, higher abundance of methanogens with different diversity, than barley-based feed blocks. Goats fed with barley-based feed blocks have higher lactose content in milk than those fed with tomato and cucumber feed blocks.

Third

The partial concentrate replacement with tomato and cucumber waste feed blocks in goat diets showed the effects describe below:

1. Did not modify either the metabolizable energy or the nitrogen balance in non-productive or lactating goats. The urine nitrogen excretion was reduced in lactating goats, which has environmental implications. Diets containing cucumber feed blocks increased the microbial nitrogen flow to the duodenum and the efficiency of microbial protein synthesis.
2. Increased the ruminal concentration of volatile fatty acids in non-productive goats, and without changes in lactating animals. There were no changes on pH. The ruminal ammonium concentration was reduced in lactating goats.
3. Reduced methane emissions by 25% in non-productive goats, and about 39% in lactating animals, which effect was due not only to the inclusion of waste fruits but was also a feed block effect. Reductions in methane emission were not always followed by increased proportions on propionate concentrations in the rumen, which could be possible when other methabolic pathways take place during methanogenesis. The density of rumen bacteria, which was determined by quantitative PCR, was not modified in non-

Capítulo 6

productive and lactating goats. There was an increased on the density of methanogens in non productive goats, but without changes in lactating animals. The analysis of the diversity structure of methanogens population was performed with a 454 sequencing analyzer, which results showed the important role that microbial diversity and community structure play during the methanogenesis. Probably, the less abundant genus and species could be strongly involved in methane production. In non-productive goats, arqueas from the genus *Methanomicrobium* were only present in the rumen of goats fed with tomato feed blocks, while arqueas from the genus *Methanomicrococcus* were only present in the rumen of goats fed with cucumber feed blocks.

4. Did not affect milk composition or its components, although diets containing tomato blocks promoted lower contents on essential amino acids and lactose in milk. Increased the concentration of linoleic (13%), linolenic (38%) and total polyunsaturated fatty acids (14%), while reduced the stearic acid (10%) content in milk, which makes it healthier if compared with the control diet.

Capítulo 7

Resumen

Capítulo 7

RESUMEN

El objetivo general de este trabajo de Tesis Doctoral es incorporar, en la dieta de rumiantes, desechos de invernaderos (tomate y pepino) y estudiar su potencial como alternativa a los cereales. Dado que la gestión medioambiental de esos desechos es difícil por su elevado contenido en agua, su reutilización en la alimentación del ganado contribuiría a disminuir su impacto ambiental. Por otro lado, el uso de desechos de invernadero contribuiría a disminuir el coste de la ración del ganado dados los elevados precios actuales de los cereales, cuya producción es cada vez más escasa aunque su demanda es creciente. Para establecer las condiciones prácticas de utilización de los desechos mencionados en raciones de caprino se ha estudiado, de manera secuencial, el efecto de reemplazar parcialmente un concentrado comercial por bloques multinutrientes, que contienen residuos de invernaderos, sobre la fermentación ruminal *in vitro*, el balance energético y de nitrógeno, la fermentación ruminal, la abundancia y diversidad de microorganismos en el rumen, la digestibilidad aparente de los nutrientes, la síntesis de proteína microbiana y las emisiones de metano, tanto en cabras no productivas como en lactación. Además, en estas últimas se estudio el efecto de la inclusión de distintos bloques sobre la producción y composición de la leche, con especial énfasis en el perfil de ácidos grasos de su grasa. Con objeto de comparar el potencial de los destríos de tomate y pepino con el de la cebada en los distintos estudios se han también bloques que incluían cebada.

Los resultados obtenidos *in vitro* (**experimento 1**) se incluyen en la **publicación 1**. Se utilizaron 13 dietas: una control, constituida por heno de alfalfa y concentrado en la relación 1:1 (dieta CO), y 12 dietas experimentales en las que el 50, 75 o 100% del concentrado de la dieta CO se sustituye por bloques multinutrientes que incluyen destríos de tomate (dietas T50, T75 y T100, respectivamente), pepino (dietas C50, C75 y C100, respectivamente), una mezcla 1:1 de tomate y pepino (dietas TC50, TC75 y TC100, respectivamente) o cebada (dietas B50, B75 y B100, respectivamente). Para estudiar el efecto del tipo de bloque y del nivel de sustitución de concentrado por bloque, así como la interacción entre ambos factores, se llevaron a cabo 4 series de incubaciones, durante 72 horas, de 500 mg de MS de las diferentes dietas en frascos Wheaton. El tipo de bloque no afectó ($P \geq 0,25$) a ninguno de los parámetros estudiados. Sin embargo, el nivel de sustitución de concentrado por el bloque afectó ($P \leq 0,042$) a los valores de pH, producción de gas, concentraciones de CH₄ y AGVs totales, relaciones acetato/propionato y CH₄/AGVs y proporciones molares de acetato y butirato. La asíntota de producción de gas y la velocidad de degradación también se vieron

afectadas ($P < 0,001$) por el nivel de sustitución del concentrado por bloque. Aunque no se observó ningún efecto ($P = 0,27$) sobre la abundancia de arqueas metanogénicas, sí hubo una tendencia ($P = 0,082$) hacia mayores densidades de bacterias con niveles de sustitución de concentrado del 75%. En resumen, la sustitución de un concentrado comercial por bloques multinutrientes, modificó la fermentación ruminal, la digestibilidad de la MS y FND, y tuvo un efecto antimetanogénico, siendo estos efectos más pronunciados con niveles crecientes de sustitución del concentrado por bloque. Los resultados obtenidos en este primer ensayo apuntaron hacia la utilización de niveles de sustitución en el rango 50-75% como más adecuado para posteriores ensayos *in vivo*.

Previamente al desarrollo de los experimentos *in vivo*, se realizó, en cabras no productivas, una prueba para conocer la ingesta y palatabilidad de los bloques que se habían utilizado *in vitro*. Los resultados obtenidos, tanto *in vitro* como en esta prueba, permitieron seleccionar las dietas a utilizar en los ensayos con cabras no productivas (**experimento 2**) y en lactación (**experimento 3**).

Los resultados de reemplazar el 50% del concentrado, en dietas a base de heno de alfalfa en cabras en mantenimiento (**experimento 2**), por bloques se recogen en la **publicación 2**. Se siguió un diseño experimental en cuadrado latino 4 x 4 utilizándose 4 cabras de raza Granadina no productivas y 4 dietas constituidas por heno de alfalfa y concentrado en la relación 1:1 (dieta AC) o en la relación 1:0,5 más bloques multinutrientes que incluían destríos de tomate (dieta ACT), pepino (dieta ACC) o cebada (dieta ACB). En cada período, las dietas se asignaron, de forma aleatoria, a cada una de las cabras. Las ingestas de bloques fueron de $203 \pm 72,9$; $179 \pm 39,7$ y $144 \pm 68,1$ g de material fresca por animal y día, para las dietas ACT, ACC y ACB, respectivamente, consiguiéndose un descenso de los costes de alimentación de aproximadamente un 32% con las dietas que contienen bloques. La sustitución de un 50% del concentrado por bloques que incluyen destríos de tomate o pepino no comprometió ($P > 0,05$) la utilización metabólica y digestiva del N ni de la energía. La utilización de bloques de pepino redujo ($P = 0,019$) la relación BP:N en el pellet de bacterias totales, aislado del contenido ruminal. La utilización de bloques de tomate redujo ($P = 0,042$) la excreción de derivados púricos en orina y el flujo de N microbiano ($P = 0,030$), aunque no afectó a su eficiencia de síntesis y, además, redujo las emisiones de metano en un 33% ($P < 0,001$), en comparación con la dieta testigo. La inclusión de bloques de tomate y pepino promovió una mayor concentración de AGVs ($P < 0,001$) y de las proporciones molares de propionato y butirato ($P \leq 0,018$) en el rumen, en comparación con las dietas AC y ACB. No

Capítulo 7

se observó efecto ($P = 0,072$) de las dietas sobre la densidad de bacterias totales en el rumen, mientras que la abundancia de arqueas metanogénicas aumentaba ($P = 0,015$) cuando se incluían bloques con destríos de invernaderos en la dieta. La utilización de nutrientes y energía se vio comprometida ($P \leq 0,049$) cuando se utilizaron bloques que incluían cebada, promoviendo estos, además, un patrón de fermentación de peor calidad que cuando los bloques incluían destríos de invernaderos. Por otro lado, el flujo de AA al duodeno no se vio afectado ($P \geq 0,056$) por la dieta, aunque los valores medios de EAA fueron más bajos en los animales alimentados con la dieta que incluía bloque con tomate. Los resultados de este trabajo sugieren que los bloques de pepino podrían reemplazar un 50% del concentrado en la dieta de cabras en mantenimiento, sin afectar de forma negativa a la fermentación ruminal, utilización de nutrientes y energía, y sin aumentar las emisiones de metano. Sin embargo, la dieta que incluía bloques con tomate mostró un fuerte potencial antimetanogénico, aunque reducía el flujo de N microbiano al duodeno.

En 8 cabras de raza granadina en lactación se estudió (**experimento 3**), siguiendo un diseño en cuadrado latino 4 x 4 con repetición, el efecto de reemplazar un 35% de un concentrado comercial por bloques multinutrientes que incluían destríos de tomate, pepino o cebada en la dieta sobre la utilización de nutrientes, fermentación ruminal, flujo de N microbiano al duodeno y eficiencia de síntesis, cantidad y composición de la leche producida, emisiones de metano y densidad de bacterias totales y de arqueas metanogénicas. Los resultados se recogen en las **publicaciones 3 y 4**. Las dietas consistieron en heno de alfalfa y concentrado en una relación 1:1 (dieta AC) o dietas en las que el 35% del concentrado fue reemplazado por bloques que incluían destríos de tomate (dieta ACT), pepino (dieta ACC) o cebada (dieta ACB). En cada período, cada dieta se asignó de forma aleatoria a dos cabras. Las ingestas de bloques que incluían tomate, pepino y cebada fueron de $231 \pm 68,7$, $238 \pm 58,9$ y $223 \pm 88,4$ g de material fresca por animal y día, respectivamente, con una reducción de los costes de alimentación de aproximadamente 22% para aquellas dietas que incluían bloques, en comparación con la dieta control. La sustitución de un 35% del concentrado por bloques no comprometió ($P \geq 0,061$) la digestibilidad aparente de nutrientes, la excreción de derivados púricos en orina, ni las abundancias de bacterias totales y arqueas metanogénicas. Además, la energía digestible y la excretada en forma de metano y orina, fueron mayores ($P \leq 0,026$) en animales alimentados con la dieta AC que en aquellos que recibían las dietas que incluían bloques, aunque la EM no se vio afectada ($P = 0,575$) por la dieta. Con las dietas que incluían destríos de invernadero se redujeron la excreción de N en

orina ($P = 0,037$) y las emisiones de metano ($P < 0,001$), en comparación con la dieta control, lo cual es de gran importancia medioambiental. La dieta que contenía el bloque con tomate disminuyó ($P \leq 0,047$) el flujo de N microbiano al duodeno y la eficiencia de síntesis de proteína microbiana en el rumen, mientras que las cabras alimentadas con dietas que incluían bloques de pepino mostraron los valores más elevados en ambos parámetros. Además, las dietas con los bloques que incluían cebada o destríos de invernadero promovieron una menor concentración en AGVs ($P < 0,001$) y $\text{NH}_3\text{-N}$ ($P = 0,003$), respectivamente, en el rumen de los animales. La inclusión de bloques en la dieta no modificó ($P \geq 0,067$) la cantidad de leche producida ni su composición, excepto el contenido en lactosa ($P \leq 0,037$), que fue menor en la leche de cabras alimentadas con la dieta ACT, en comparación con las otras dietas estudiadas. Tampoco se encontraron diferencias en el perfil aminoacídico de la leche, aunque se observó una tendencia ($P = 0,062$) hacia una menor concentración en EAA en la leche de cabras alimentadas con las dietas que incluían bloques de tomate y cebada. La leche de cabras alimentadas con las dietas que incluían bloques de tomate y pepino tenía una mayor concentración de los ácidos linoleico, linolénico y polinsaturados totales en comparación con la dieta AC. En resumen, los resultados de este experimento indican que los bloques de tomate y pepino podrían sustituir un 35% del concentrado en la dieta de cabras en lactación, reduciendo los costes de alimentación y la producción de metano, sin comprometer la fermentación ruminal, la utilización de nutrientes ni la producción de leche y promoviendo un perfil de ácidos grasos en la leche más saludable, en comparación con la dieta testigo o la que incluía bloques con cebada.

Las muestras de contenido ruminal de las cabras utilizadas en los **experimentos 2 y 3** se han utilizado también para estudiar la diversidad de arqueas metanogénicas mediante técnicas de secuenciación de nueva generación 454 GS FLX Titanium. Los resultados preliminares de que se dispone indican que en las muestras analizadas las arqueas más abundantes son del género *Methanobrevibacter* (23-49%), seguidas de las de los géneros *Methanomicrobium* (2-9,5%) y *Methanosphaera* (0,9-7%). No obstante, se observan ciertas variaciones dentro de estas poblaciones, sobre todo en cabras en mantenimiento, que podrían asociarse con las distintas respuestas observadas en las emisiones de metano a las dietas experimentales.

Los resultados de este trabajo muestran el potencial que tienen los subproductos de invernadero, incluidos en forma de bloques multinutrientes en la dieta de caprino tanto en mantenimiento como en lactación, para reemplazar parcialmente al concentrado. Es posible

Capítulo 7

que las diferencias encontradas en el patrón de fermentación entre animales productivos y no productivos, se deban a los distintos niveles de sustitución de concentrado empleados (50% en la dieta de animales en mantenimiento y 35% en la de animales en lactación) y al estado fisiológico del animal. De manera global, la sustitución parcial de concentrado por bloques que contenían destríos de invernaderos redujo las emisiones de CH₄ y no afectó negativamente al patrón de fermentación ruminal, siendo además la dieta que incluía bloque de pepino la que mostró un mayor flujo de N microbiano y eficiencia de síntesis de N microbiano. Además, la utilización de bloques de tomate y pepino en cabras en lactación no afectó a la producción de leche, ni al contenido de la mayor parte de sus componentes, promoviendo un perfil en ácidos grasos de la leche más saludable. No obstante, sería recomendable modificar la formulación de los bloques de tomate para mejorar el flujo de N microbiano y de EAA al duodeno y su eficiencia de síntesis, así como el contenido en EAA en leche.

SUMMARY

The aim of this work was to study the potential of using multinutrient blocks including waste fruits of tomato and cucumber in ruminant's diet as an alternative to concentrates. The environmental management of those wastes is difficult due to their high water content. Therefore, their recycling in animal feeding is of interest in order to diminish their environmental impact. On the other hand, the utilization of wastes from greenhouse horticulture could decrease animal feeding cost, through a reduction of the amount of cereals used, which becomes expensive due to its scarcity and increasing demand. In order to establish the practical conditions of wastes inclusion in ruminant's diet, we studied the effects of replacing a commercial concentrate with feed blocks including waste fruits from tomato and cucumber culture in greenhouse, on *in vitro* ruminal fermentation, energy and nitrogen balances, ruminal fermentation, rumen microbial abundances and diversity, nutrients apparent digestibility, microbial protein synthesis and methane emissions in non-productive and lactating goats. Furthermore, the effect of including feed blocks in lactating goat's diet, on milk yield and quality was studied, being observed changes on the fatty acid profile in milk of special interest. In order to compare the effects of tomato and cucumber fruits with those of barley multinutrient blocks including barley grain were used in all the experiments as well.

The results obtained *in vitro* (**experiment 1**) are described in **publication 1**. Thirteen diets were used: a control diet, made of alfalfa hay and concentrate in a 1:1 ratio (diet CO), and 12 experimental diets in which the 50, 75 or 100% of the concentrate from the CO diet was replaced with feed blocks containing tomato (diets T50, T75 and T100, respectively), cucumber (diets C50, C75 and C100, respectively), a mixture of tomato and cucumber wastes in a 1:1 ratio (diets TC50, TC75 and TC100, respectively) or barley grain (diets B50, B75 and B100, respectively). Four incubation runs, of 72 hours each, were carried out in batch cultures of mixed rumen microorganisms by incubating 500 mg of DM of the experimental diets, to study the effects of the type of feed block, the level of concentrate substitution and their interaction. The type of feed-block did not affect ($P \geq 0.25$) the studied parameters. However, the level of concentrate replacement with blocks affected ($P \leq 0.042$) the pH, gas production, CH₄, total VFA concentration, acetate/propionate and CH₄/Total VFAs ratios and molar proportions of acetate and butyrate. The potential gas production and the degradation rate were also affected ($P < 0.001$) by the level of concentrate replacement. Although, methanogens abundance was

Capítulo 7

not affected ($P = 0.27$), a trend ($P = 0.082$) to higher total bacteria abundance with 75% of concentrate replacement was observed. Then, the replacement of a commercial concentrate with feed blocks modified *in vitro* ruminal fermentation, DM and NDF digestibility and had an antimethanogenic effect, being more pronounced with increasing levels of concentrate replacement with feed blocks. The results obtained in **experiment 1** suggest the range 50-75% of concentrate substitution with blocks as the most adequate to be used in further *in vivo* experiments.

A trial to study both the palatability and intake of blocks used *in vitro* was carried out in non-productive goats previously to the *in vivo* experiments 2 and 3 development. The results obtained together with those from the *in vitro* experiment were used to state the experimental diets to be used for further experiments in non-productive (**experiment 2**) and lactating goats (**experiment 3**).

The results of replacing 50% of concentrate in alfalfa hay based diets for non-productive goats (**experiment 2**) are presented in **publication 2**. Four adult dry non-pregnant rumen-fistulated Granadina goats were used in a 4 x 4 Latin square experimental design, to study 4 diets: alfalfa hay plus concentrate in a 1:1 ratio (diet AC) or 1:0.5 plus feed blocks including wastes of tomato fruit (diet ACT), cucumber (diet ACC) or barley (diet ACB). The effects of the experimental diets on nutrient utilization, ruminal fermentation, microbial N flow to the duodenum and efficiency of synthesis, methane emissions and abundances of total bacteria and methanogens in the rumen were studied. In each period, each goat was randomly assigned to one of the diets. The intakes of the feed blocks were 203 ± 72.9 , 179 ± 39.7 and 144 ± 68.1 g per animal and day, for diets ACT, ACC and ACB, respectively, with a reduction in feeding cost of 32% with feed blocks-containing diets. The replacement of 50% of concentrate with feed blocks including tomato or cucumber wastes did not compromise ($P > 0.05$) the N and energy digestive and metabolic utilization. Diet including cucumber-based blocks decreased ($P = 0.019$) the PB:N ratio in bacterial pellets isolated from the rumen content. Diet including tomato-based feed blocks decreased purine derivatives urinary excretion ($P = 0.042$) and microbial N flow ($P = 0.030$) without affecting the efficiency of synthesis and decreasing ($P < 0.001$) methane emission by 33% compared with the control diet. Diets including tomato and cucumber-based feed blocks lead to higher rumen VFA concentration ($P < 0.001$) and molar proportions of propionate and butyrate ($P \leq 0.018$) than AC and ACB diets. No effect ($P = 0.072$) of diet on total bacteria

abundance was observed while the abundance of methanogens increased ($P = 0.015$) with diets including wastes-based feed blocks. Diets with feed blocks including barley compromised ($P \leq 0.049$) nutrients and energy utilization and promoted a worse fermentation pattern than diets with feed blocks including waste fruits. The amino acid N flow to the duodenum was not affected ($P \geq 0.056$) by diet, but numerically lower average values of EAA were found in goats fed diet including tomato-based feed blocks. Our study suggests that cucumber feed blocks could replace half of the amount of concentrate in unproductive goat diet without compromising rumen fermentation, nutrient and energy utilization and without increasing methane emissions. However, diets including tomato feed blocks showed a strong antimethanogenic potential, but reduced microbial N flow to the duodenum.

Eight Granadina goats in the middle of the third lactation were used in a 4 x 4 Latin square experimental design with repetition to study (**experiment 3**) the effects of replacing 35% of a commercial concentrate with feed blocks including waste fruits of tomato, cucumber or barley grain in diet on nutrient utilization, ruminal fermentation, microbial N flow to the duodenum and efficiency of synthesis, milk yield and composition, methane emissions and abundances of total bacteria and methanogens. The results are described **in publications 3 and 4**. Diets consisted of alfalfa hay plus concentrate in a 1:1 ratio (diet AC) or 1:0.65 and feed blocks including wastes of tomato fruits (diet ACT), cucumber (diet ACC) or barley (diet ACB). In each period, two goats were randomly assigned to one of the dietary treatments. The intakes of feed blocks including tomato, cucumber and barley were 231 ± 68.7 , 238 ± 58.9 and 223 ± 88.4 g of fresh matter per animal and day, respectively, with a reduction in feeding cost of 22% with feed blocks containing diets in comparison to the control diet. The replacement of 35% of concentrate with feed blocks did not compromise ($P \geq 0.061$) nutrient apparent digestibility, total purine derivatives urinary excretion, and total bacteria and methanogens abundances. In addition, digestible energy and that in methane and urine were higher ($P \leq 0.026$) for diet AC than for feed blocks containing diets, whereas ME was not affected ($P = 0.575$) by diet. The inclusion of wastes from greenhouse horticulture in feed blocks decreased N in urine ($P = 0.037$) and CH_4 emissions ($P < 0.001$) in comparison with control diet, which is environmentally important. Diet including tomato-based feed blocks decreased ($P \leq 0.047$) microbial N flow and efficiency of synthesis in the rumen, whereas goats fed diet including

Capítulo 7

cucumber-based feed blocks showed the highest values for both parameters. Moreover, diets including any type of feed blocks lead to lower rumen VFA ($P < 0.001$) and $\text{NH}_3\text{-N}$ ($P = 0.003$) concentrations, respectively. Although, feed blocks utilization did not modified ($P \geq 0.067$) milk yield or most of its components, lactose yield and concentration were lower ($P \leq 0.037$) with ACT diet in comparison with control and the other experimental diets. There were no differences in milk amino acid profile, but a trend ($P = 0.062$) to lower EAA concentration in goats fed diets including tomato and barley-based blocks was found. Milk from goats fed diets including tomato and cucumber feed blocks showed higher linoleic, linolenic and total polyunsaturated fatty acids concentrations than that from goats fed diet AC. Overall, our study suggests that tomato and cucumber feed blocks could replace 35% of the amount of concentrate in dairy goat diet reducing animal feeding cost and methane production, leading to healthier fatty acid profile in milk and without compromising ruminal fermentation, nutrient utilization or milk yield, in comparison with AC and ACB diets.

The rumen content samples isolated from goats used in **experiments 2** and **3** have been used to analyse the diversity of methanogens by using high-throughput sequencing technologies (454 GS-FLX Titanium). Available preliminary results indicate that archaeas in samples belong mainly to *Methanobrevibacter* genus (23-49%), followed by *Methanomicrobium* (2-9.5%) and *Methanosphaera* (0.9-7%). However, some variations among these genres were observed between diets, being more significant in non-productive goats than in dairy animals.

The results from this work show the potential of waste fruits from greenhouse horticulture, included in feed blocks, to partially replace the concentrate in non-productive and productive goat's diet. Differences found in the ruminal fermentation pattern between productive and non-productive goats might be due to differences in the proportion of concentrate replaced (50% in the diet of non productive goats and 35% in that of dairy goats) and the physiological status of the animals. Overall, our results suggest that partial replacement of concentrate with feed blocks containing waste fruits from greenhouse horticulture, reduced methane emissions, without compromising the ruminal fermentation pattern, the diet containing cucumber feed blocks showing the highest microbial N flow and efficiency of synthesis. Moreover, feeding lactating goats with diets including tomato and cucumber feed blocks did not affect either the milk yield or the proportions of most part of its components, leading to a healthier fatty acid

profile. We suggest doing some modifications in the formula of tomato-based feed blocks in order to improve the microbial N and EAA flow, efficiency of microbial N synthesis and milk content in EAA promoted by this diet.

Capítulo 8

Bibliografía¹

¹Referencias de todo el texto, exceptuando las que aparecen exclusivamente en el capítulo de resultados.

- Abbeddou, S., Riwahi, S., Iñiguez, L., Zaklouta, M., Hess, H.D., and Kreuzer, M. 2011a. Ruminal degradability, digestibility, energy content, and influence on nitrogen turnover of various Mediterranean by-products in fat-tailed *Awassi* sheep. *Animal Feed Science and Technology*. 163: 99-110.
- Abbeddou, S., Rischkowsky, B., Richter, E. K., Hess, H. D., and Kreuzer, M. 2011b. Modification of milk fatty acid composition by feeding forages and agro-industrial byproducts from dry areas to *Awassi* sheep. *Journal of Dairy Science*. 94:4657-4668.
- Abe, M., Iriki, T., Tobe, N., and Shibui, H. 1981. Sequestration of holotrich protozoa in the reticulo-rumen of cattle. *Applied and Environmental Microbiology*. 41: 758-765.
- Abecia, L., Martín-García, A.I., Martínez, G., Tomkins, N.W., Molina-Alcaide, E., Newbold, C.J., and Yáñez-Ruiz, D.R. 2011. Manipulation of the rumen microbial ecosystem to reduce methane emissions in ruminants through the intervention at early life stage of pre-ruminants and their mothers. In: *Proc. 8th Int. Symp. Nutrition of Herbivores*, Aberystwyth, UK. *Advances in Animal Biosciences*. 2:271.
- Abecia, L., Toral, P.G., Martín-García, A.I., Martínez, G., Tomkins, N.W., Molina-Alcaide, E., Newbold, C.J., and Yáñez-Ruiz, D.R. 2012. Effect of bromochloromethane on methane emission, rumen fermentation pattern, milk yield, and fatty acid profile in lactating dairy goats. *Journal of Dairy Science*. 95:2027-2036.
- AFRC, Agricultural and Food Research Council. 1998. *The Nutrition of Goats*. CAB International. Nueva York. 41-51.
- Aguilera, J.F., Prieto, C., and Fonollá, J. 1990. Protein and energy metabolism of lactating Granadina goats. *The British Journal of Nutrition*. 63:165-75.
- Akin, D.E., and Rigsby, L.L. 1987. Mixed fungal populations and lignocellulosic tissue degradation in the bovine rumen. *Applied and Environmental Microbiology*. 53:1987-1995.
- Alfárez, M.J.M., Barrionuevo, M., López-Aliaga, I., Sanz Sampelayo, M.R., Lisbona, F., Robles, J.C., and Campos, M.S. 2001. Digestive utilization of goat and cow milk fat in malabsorption syndrome. *Journal of Dairy Science*. 64:451-461.
- Allison, M.J. 1980. Nitrogen requirements of rumen microbial. In: *Proc. Int. Symp. Protein requirements for cattle* (Ed. F.N. Owens), Oklahoma State University, Stillwater, USA. 128-135.
- Amann, R.I., Ludwig, W., and Schleifer, K.H. 1995. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiological Reviews*. 59:143-169.
- Andersen, J.B., Friggens, N.C., Sejrsen, K., Sørensen, M.T., Munksgaard, L., and Ingvarsten, K.L. 2003. The effects of low vs high concentrate level in the diet on performance in cows milked two or three times daily in early lactation. *Livestock Production Science*. 81:119-128.
- Andersson, A.F., Lindberg, M., Jakobsson, H., Bäckhed, F., Nyrén, P., and Engstrand, L. 2008. Comparative analysis of human gut microbiota by barcoded pyrosequencing. *PloS one*. 3:28-36.

Capítulo 8

- Andrade, H., Bernal, G., and Llamas, G. 1996. Influence of different alfalfa:sorghum ratios in the diet of dairy goats on productivity and rumen turnover. *Small Ruminant Research*. 21:77-82.
- Andrade, P.V.D., and Schmidely, Ph. 2006. Influence of percentage of concentrate in combination with rolled canola seeds on performance, rumen fermentation and milk fatty acid composition in dairy goats. *Livestock Science*. 104:77-90.
- Antoniewicz, A.M., Heineman, W.W., and Hanks, E.M. 1980. The effects of changes in the intestinal flow of nucleic acids on allantoin excretion in the urine of sheep. *Journal of Agricultural Science*. Cambridge. 109:7-12.
- ARC, Agricultural Research Council. 1980. *The Nutrient Requirements of Ruminant Livestock*. Technical Review, Farnham Royal: CAB.
- ARC, Agricultural Research Council. 1984. *The Nutrient Requirement of Ruminant Livestock* (No.1). Commonw. Agric. Bureaux, Slough, UK.
- Archimède, H., Sauvant, D., Hervieu, J., Ternois, F., and Poncet, C. 1996. Effects of the nature of roughage and concentrate and their proportion on ruminal characteristics of non lactating goats, consequences on digestive interactions. *Animal Feed Science Technology*. 58:267-282.
- Archimède, H., Sauvant, D., and Schmidely, P. 1997. Quantitative review of ruminal and total tract digestion of mixed diet organic matter and carbohydrates. *Reproduction Nutrition Development*. 37:173-189.
- Aregheore, E.M. 2006. Utilization of concentrate supplements containing varying levels of copra cake (*Cocos nucifera*) by growing goats fed a basal diet of napier grass (*Pennisetum purpureum*). *Small Ruminant Research*. 64:87-93.
- Armentano, L.E. 1992. Ruminant hepatic metabolism of volatile fatty acids, lactate and pyruvate. *Journal of Nutrition*. 122:838-842.
- Ashelford, K.E., Chuzhanova, N.A., Fry, J.C., Jones, A.J., and Weightman, A.J. 2005. At least 1 in 20 16S rRNA sequence records currently held in public repositories is estimated to contain substantial anomalies. *Applied and Environmental Microbiology*. 71: 7724-7736.
- Atkinson, R.L., Scholljegerdes, E.J., Lake, S.L., Nayigihugu, V., Hess, B.W., and Rule, D.C. 2006. Site and extent of digestion, duodenal flow, and intestinal disappearance of total and esterified fatty acids in sheep fed a high-concentrate diet supplemented with high- linoleate sunflower oil. *Journal of Animal Science*. 84: 387-396.
- Babayan, V.K. 1981. Medium chain length fatty acid esters and their medical and nutritional application. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 58: 49A-51A.
- Bach, A., Calsamiglia, S., and Stern, M.D. 2005. Nitrogen metabolism in the rumen. *Journal of Dairy Science*. 88:9-21.
- Balcells, J., Fondevila, M., Guada, J.A., Castrillo, C., and Surra, J.C.E. 1993. Urinary excretion of purine derivatives and nitrogen in sheep given straw supplemented with different sources carbohydrate. *Animal Production*. 57:287-292.

- Balcells, J., Guada, J.A., Castrillo, C., and Gasa, J. 1991. Urinary excretion of allantoin and allantoin precursors by sheep after different rates of purine infusion into the duodenum. *Journal of Agriculture Science*. 116:309-317.
- Balch, W.E., Fox, G.E., Magrum, L.J., Woese, C.R., and Wolfe, R.S. 1979. Methanogens: reevaluation of a unique biological group. *Microbiological Reviews*. 43:260–296.
- Bannink, A., Kogut, J., Dijkstra, J., France, J., Kebreab, E., Van Vuuren, A.M., and Tamminga, S. 2006. Estimation of the stoichiometry of volatile fatty acid production in the rumen of lactating cows. *Journal of Theoretical Biology*. 238: 36-51.
- Bargo, F., Muller, L.D., Delahoy, J.E., and Cassidy, T.W. 2002. Milk response to concentrate supplementation of high producing Dairy cows grazing at two pasture allowances. *Journal of Dairy Science*. 85:1777-1792.
- Barry, T.N., and McNabb, W.C. 1999. The implications of condensed tannins on the nutritive value of temperate forages fed to ruminants. *British Journal of Nutrition*. 81:263–272.
- Bauchop, T., and Mountfort, D.O. 1981. Cellulose fermentation by a rumen anaerobic fungus in both the absence and presence of rumen methanogens. *Applied and Environmental Microbiology*. 42:1103-1110.
- Bauman, D.E., Perfield, J.W., de Veth, M.J., and Lock, A.L. 2003. New perspectives on lipid digestion and metabolism in ruminants. *Proceedings Cornell Nutrition Conference*. 175-189.
- Beauchemin, K.A., Kreuzer, M., O'Mara, F., and McAllister, T.A. 2008. Nutritional management for enteric methane abatement: a review. *Australian Journal of Experimental Agriculture*. 48: 21–27.
- Beauchemin, K.A., McAllister, T.A., and McGinn, S.M. 2009a. Dietary mitigation of enteric methane from cattle. *CAB Reviews: Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources*. 4:1–18.
- Beauchemin, K.A., and McGinn, S.M. 2006. Methane emissions from beef cattle: effects of fumaric acid, essential oil, and canola oil. *Journal of Animal Science*. 84: 1489–1496.
- Beauchemin, K.A., McGinn, S.M., and Petit, H.V. 2007a. Methane abatement strategies for cattle: lipid supplementation of diets. *Canadian Journal of Animal Science*. 87: 431–440.
- Beauchemin, K.A., McGinn, S.M., Martinez, T.F., and McAllister, T.A. 2007b. Use of condensed tannin extract from quebracho trees to reduce methane emissions from cattle. *Journal of Animal Science*. 85: 1990–1996.
- Beauchemin, K.A., McGinn, S.M., Benchaar, C., and Holtshausen, L. 2009b. Crushed sunflower, flax, or canola seeds in lactating dairy cow diets: effects on methane production, rumen fermentation, and milk production. *Journal of Dairy Science*. 92:2118–2127.

Capítulo 8

- Beauchemin, K.A., Yang, W.Z., and Rode, L.M. 2003. Effects of particle size of alfalfa-based dairy cow diets on chewing activity, ruminal fermentation, and milk production. *Journal of Dairy Science*. 86:630-643.
- Beever, D., Cammell, S., Sutton, J., Spooner, M., Haines, M., and Harland, J. 1989. Effect of concentrate type on energy utilisation in lactating dairy cows. *Proceedings 11th Symposium on Energy Metabolism EAAP*, Publication No. 43:33.
- Belenguer, A., Toral, P. G., Frutos, P. and Hervás, G. 2010. Changes in the rumen bacterial community in response to sunflower oil and fish oil supplements in the diet of dairy sheep. *Journal of Dairy Science*. 93: 3275-3286.
- Belenguer, A., Yañez, D., Balcells, J., Ozdemir-Baber, N.H., Gonzalez-Ronquillo, M. 2002. Urinary excretion of purine derivatives and prediction of rumen microbial outflow in goats. *Livestock Production Science*. 77:127-135.
- Belewu, M.A., Ademilola, A.A. 2002. Digestibility response of WAD goat to Mushroom (*Volvariella volvaceae*) treated cotton waste. *Moor Journal of Agricultural Research*. 3:83-86.
- Benchaar, C., Pomar, C., and Chiquette, J. 2001. Evaluation of dietary strategies to reduce methane production in ruminants: a modelling approach. *Canadian Journal of Animal Science*. 81: 563–574.
- Bendall, J.G. 2001. Aroma compounds of fresh milk from New Zealand cows fed different diets. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 49:4825–4832.
- Bender, R.C., Maynard, L.A. 1932. Fat metabolism in the lactating goat. *Journal of Dairy Science*. 15:242- 253.
- Ben-Ghedalia, D., McMeniman, N.P., and Armstrong, D.G. 1978. The effect of partially replacing urea nitrogen with protein N on N capture in the rumen of sheep fed a purified diet. *British Journal of Nutrition*. 39:37-44.
- Benjamin, S., and Spener, F. 2009. Conjugated linoleic acids as functional food: An insight into their health benefits. *Nutrition and Metabolism Journal*. (Lond.) 6:36.
- Ben Salem, H. 2010. Nutritional management to improve sheep and goat performances in semiarid regions. *Revista Brasileira de Zootecnia*. 39: 337-347.
- Ben Salem, H., Ben Salem, I., Nefzaoui, A. and Ben Saïd, M.S. 2003. Effect of PEG and olive cake feed blocks supply on feed intake, digestion, and health of goats given kermes oak (*Quercus coccifera L.*) foliage. *Animal Feed Science and Technology*. 110: 45-59.
- Ben Salem, H., and Makkar. 2010. Simple and Environmentally Friendly Options to Improve Livestock Performance under Smallholder Conditions. *Sustainable Improvement of Animal Production and Health*. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome. 121–126.
- Ben Salem, B., Makkar, H., and Nefzaoui, A. 2001. Towards better utilisation of non-conventional feed sources by sheep and goats in some African and Asian countries. *Sub-network on sheep farming*. 177-187.
- Ben Salem, H., Makkar, H.P.S., Nefzaoui, A., Hassayoun, L., and Abidi, S. 2005. Benefit from the association of small amounts of tannin-rich shrub foliage

- Acacia cyanophylla* Lindl. with soya bean meal given as supplements to Barbarine sheep fed on oaten hay. *Animal Feed Science and Technology*. 122: 173–186.
- Ben Salem, H. and Nefzaoui, A. 2003. Feed blocks as alternative supplements for sheep and goats. *Small Ruminant Research*. 49: 275-288.
- Ben Salem, H., Nefzaoui, A., and Ben Salem, L. 2000. Supplementing range goats in Central Tunisia with feed blocks or a mixture of *Opuntia ficus indica* var. *inermis* and *Atriplex nummularia*. Effects on behavioural activities and growth. *In Proceedings of the Seventh International Conference on Goats*, France, May 15-21: 988-989.
- Ben Salem, H., and Smith, T. 2008. Feeding strategies to increase small ruminant production in dry environments. *Small Ruminant Research*. 77:174-194.
- Ben Salem, H., and Znaidi, I.A. 2008. Partial replacement of concentrate with tomato pulp and olive cake-based feed blocks as supplements for lambs fed wheat straw. *Animal Feed Science and Technology*. 147: 206-222.
- Benson, D.A., Karsch-Mizrachi, I., Lipman, D.J., Ostell, J., and Wheeler, D.L. 2005. GenBank. *Nucleic Acids Research*. 33: D34-D38.
- Bequette, B.J., Backwell, F.R.C., and Crompton, L.A. 1998. Current concepts of amino acid and protein metabolism in the mammary gland of the lactating ruminant. *Journal of Dairy Science*. 81:2540–2559.
- Berge, Ph., Dulphy, J.P. 1991. Etude des interactions entre fourrage et aliment concentré chez le mouton. II. Factors de variation de la digestibilité. *Annales de Zootechnie*. 40:227-246.
- 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.
- Bernard, L., Rouel, J., Leroux, C., Ferlay, A., Faulconnier, Y., Legrand, P., and Chilliard, Y. 2005. Mammary lipid metabolism and milk vegetable lipids. *Journal of Dairy Science*. 88: 1478-1489.
- Bernard, L., Shingfield, K.J., Rouel, J., Ferlay, A., and Chilliard, Y. 2009. Effect of plant oils in the diet on performance and milk fatty acid composition in goats fed diets based on grass hay or maize silage. *British Journal of Nutrition*. 101:213-224.
- Bevilacqua, C., Martin, P., Candalh, C., Fauquant, J., Piot, M., Roucayrol, A.M., Pilla, F., and Heyman, M. 2001. Goats' milk of defective α_{S1} -casein genotype decreases intestinal and systemic sensitization to β -lactoglobulin in guinea pigs. *Journal of Dairy Science*. 68: 217–227.
- Blaxter, K.L., and Clapperton, J.L. 1965. Prediction of the amount of methane produced by ruminants. *The British journal of nutrition*. 19: 511-22.
- Blaxter, K.L., and Martín, A.K. 1962. The utilization of protein as a source of energy in fattening sheep. *British Journal of Nutrition*. 16:397-407.
- Boadi, D., Benchaar, C., and Chiquette, J. 2004. Mitigation strategies to reduce enteric methane emission from dairy cows: update review. *Canadian Journal of Animal Science*. 84:319–335.

Capítulo 8

- Bouattour, M.A., Casals, R., Albanell, E., Such, X., and Caja, G. 2008. Feeding soybean oil to dairy goats increases conjugated linoleic acid in milk. *Journal of Dairy Science*. 91:2399-2407.
- Bourre, J. 2005. Where to find omega-3 fatty acids and how feeding animals with diet enriched in omega-3 fatty acids to increase nutritional value of derived products for human: What is actually useful? *Journal of Nutrition Health and Aging*. 9:232-242.
- Boyazoglu, J., Hatziminaoglou, I., and Morand-Fehr, P. 2005. The role of the goat in society: Past, present and perspectives for the future. *Small Ruminant Research*. 60: 13-23.
- Boza, J., and Sanz Sampelayo, M.R. 1997. Aspectos nutricionales de la leche de cabra. *Anales de la Real Academia de Ciencias Veterinarias de Andalucía Oriental*. 10: 109–139.
- Boza, J., Silva, J.H., and Azocar, P. 1985. Recursos alimenticios en zonas áridas. In: *Simposio Internacional de la Explotación Caprina en Zonas Áridas, Fuerteventura, España*: Servicio de Publicaciones Cabildo de Fuerteventura. 191-197.
- Brenner, S., et al. 2000. Gene expression analysis by massively parallel signature sequencing (MPSS) on microbead arrays. *Nature Biotechnology*. 18: 630–634.
- Broderick, G.A., Merchen, N.R. 1992. Markers for quantifying microbial protein synthesis in the rumen. *Journal of Dairy Science*. 75:2618-2632.
- Brose, U. 2002. Estimating species richness of pitfall catches by non-parametric estimators. *Pedobiologia*. 46:101-107.
- Brulc, J., Yeoman, C., Nelson, K., and White, B. 2010. *Emerging Methods In Rumen Microbiology*. 4th Grazing Livestock. 10-12.
- Bryant, M.P. 1959. Bacterial species in the rumen. *Bacteriological Reviews*. 23:125-153.
- Bryant, M.P. 1973. Nutritional requirements of the predominant rumen cellulolytic bacteria. *Feed Production*. 32:1889-1913.
- Buddle, B.M., Denis, M., and Attwood, G.T. 2011. Strategies to reduce methane emissions from farmed ruminants grazing on pasture. *The Veterinary Journal*. 188: 11-17.
- Bueno, M.S., Ferrari, Jr.E., Bianchini, D., Leinz, F.F., and Rodrigues, C.F.C. 2002. Effect of replacing corn with dehydrated citrus pulp in diets of growing kids. *Small Ruminant Research*. 46:179-185.
- Burdge, G.C., and Calder, P.C. 2005. Conversion of α -linolenic acid to longer-chain polyunsaturated fatty acids in human adults. *Reproduction Nutrition Development*. 45: 581-597.
- Burt, S. 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *International Journal of Food Microbiology*. 94: 223–253.
- Buttery, P.J., Lewis, D. 1982. Nitrogen metabolism in the rumen. En: *Forage protein in ruminant animal production*. (D.J. Thomson, D.E. Beever, and R.G. Gunn eds). British Society of Animal Production. Occasional Publ. No. 6:1-11.

- Caballero, R., Gómez, R., Núñez, L., Vaquero, M., Tamargo, J., Delpón, E. 2006. Farmacología de los ácidos grasos omega-3. *Revista Española de Cardiología*. (Supp.) 6: 3D-19D.
- Cabiddu, A., Canu, M., Decandia, M., Molle, G., and Pompel, R. 2004. The intake and performance of dairy ewes fed with different levels of olive cake silage in late pregnancy and suckling periods. In: *Ben Salem, H., Nefzaoui, A., Morand-Fehr, P. (Eds.), Nutrition and Feeding Strategies of Sheep and Goats under Harsh Climates*. CIHEAM-IAMZ, OptionsMéditerranéennes: Série A, Zaragoza, pp. 197–201.
- 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., Ferret, A., and Devant, M. 2002. Effects of pH and pH fluctuations on microbial and nutrient flow from a dual-flow continuous culture system. *Journal of Animal Science*. 85:574-579.
- Cantalapiedra-Hijar, G. 2009. *Estudio de la utilización de nutrientes, de la fermentación y de las comunidades microbianas en el rumen de caprino y en fermentadores de flujo continuo simple*. Tesis Doctoral. Universidad de Granada. España.
- Cantalapiedra-Hijar, G., Yáñez-Ruiz, D.R., Martín-García, A.I., and Molina-Alcaide, E. 2009. Effects of forage:concentrate ratio and forage type on apparent digestibility, ruminal fermentation, and microbial growth in goats. *Journal of Animal Science*. 87: 622-631.
- Cantor, C.R., and Smith, C. 1999. *Genomics: The Science and Technology Behind The Human Genome Project*, Edn. 1 (Wiley-Interscience, Hoboken, NJ).
- Caporaso, J.G., Kuczynski, J., Stombaugh, J., Bittinger, K., Bushman, F.D., et al. 2010. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nature Methods*. 7: 335–336.
- Carro, M.D., and Ranilla, M.J. 2003. Effect of the addition of malate on in vitro rumen fermentation of cereal grains. *The British Journal of Nutrition*. 89: 181-188.
- Carro, M.D., Valdés, C., Ranilla, M.J., and González, J.S. 2000. Effect of forage to concentrate ratio in the diet on ruminal fermentation and digesta flow kinetics in sheep offered food at a fixed and restricted level of intake. *Animal Science*. 70: 127-134.
- Castel, J.M., Mena, Y., Delgado-Pertíñez, M., Camúñez, J., Basulto, J., Caravaca, F., Guzmán-Guerrero, J.L., and Alcalde, M.J. 2003. Characterization of semi-extensive goat production systems in southern Spain. *Small Ruminant Research*. 47:133- 143.
- Castel, J.M., Mena, Y., and Ruiz, F.A. 2007. El sector caprino y su contribución al desarrollo rural (*The goat sector and its contribution to rural development*). In: *Agricultura Familiar en España*. Ed. Fundación Estudios Rurales, Madrid. 246–257.
- Castel, J.M., Ruiz, F.A., Mena, Y., and Sánchez-Rodríguez, M. 2010. Present situation and future perspectives for goat production systems in Spain. *Small Ruminant Research*. 89: 207-210.

Capítulo 8

- 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.
- Cerrillo, M.A., Russell, J.R., and Crump, M.H. 1999. The effects of hay maturity and forage to concentrate ratio on digestion kinetics in goats. *Small Ruminant Research*. 32: 51-60.
- Chandramoni, S., Jadhao, B., Tiwari, C.M., and Khan, M.Y. 2000. Energy metabolism with particular reference to methane production in Muzaffarnagari sheep fed rations varying in roughage to concentrate ratio. *Animal Feed Science and Technology*. 83:287-300.
- Chardigny, J.M., Destailats, F., Malpuech-Brugère, C., Moulin, J., Bauman, D.E., Lock, A.L., Barbano, D.M., Mensink, R.P., Bezelgues, J.B., Chaumont, P., Combe, N., Cristiani, I., Joffre, F., German, J.B., Dionisi, F., Boirie, Y., and Sébédio, J.L. 2008. Do trans fatty acids from industrially produced sources and from natural sources have the same effect on cardiovascular disease risk factors in healthy subjects? Results of the Trans Fatty Acids Collaboration (TRANSFACT) study. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 87:558-566.
- Chen, M., and Wolin, M.J. 1979. Effect of monensin and lasalocid-sodium on the growth of methanogenic and rumen saccharolytic bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*. 38: 72-77.
- Chen, X.B., Hovell, F.D.D.B., Ørskov, E.R., and Brown, D.S. 1990. Excretion of purine derivatives by ruminants: effect of exogenous nucleic acid supply on purine derivative excretion by sheep. *British Journal of Nutrition*. 63:131-142.
- Chen, X.B., and Gomes, M.J. 1992. Estimation of microbial protein supply to sheep and cattle based on urinary excretion of purine derivatives: An overview of technical details. *International Feed Resource Unit*. Occasional Publ. Rowett Research Institute, Aberdeen, Reino Unido. pp. 1-21.
- Chen, X.B., Ørskov, E.R. 2004. Research on urinary excretion of purine derivatives in ruminants: past, present and future. In: H.P.S. Makkar and X.B. Chen (Editors), *Estimation of Microbial Protein Supply in Ruminants Using Urinary Purine Derivatives*. FAO/IAEA. Kluwer Academic Publishers, Vienna, Austria. pp. 180-210.
- Cheng, K.J., and Costerton, J.W. 1980. Adherent rumen bacteria. Their role in the digestion of plant material, urea and epithelial cells. In: *Digestive Physiology and Metabolism in Ruminants*, 227-250 (Eds Y. Ruckebush and P. Thivend). Lancaster, Reino Unido: MTP Press.
- Cheng, K.J., and McAllister, T.A. 1997. Compartmentation in the rumen. In: *The rumen microbial ecosystem*, 492-522 (Eds P. N. Hobson and C. S. Stewart). Londres, Reino Unido: Chapman and Hall.
- Cheng, K. J., and Wallace, R. J. 1979. The mechanism of passage of endogenous urea through the rumen wall and the role of ureolytic epithelial bacteria in the urea flux. *British Journal of Nutrition*. 42: 553-557.

- Cheng, Y.F., Mao, S.Y., Liu, J.X., and Zhu, W.Y. 2009. Molecular diversity analysis of rumen methanogenic Archaea from goat in eastern China by DGGE methods using different primer pairs. *Letters in Applied Microbiology*. 48:585-592.
- Chesson, A., and Forsberg, C.W. 1997. Polysaccharide degradation by rumen microorganisms. In: *The Rumen Microbial Ecosystem*. 329-381 (Eds P. N. Hobson and C. S. Stewart). Londres, Reino Unido: Chapman and Hall.
- Chilliard, Y., Ferlay, A., Mansbridge, R.M., and Doreau, M. 2000. Ruminant milk fat plasticity: nutritional control of saturated, polyunsaturated, trans and conjugated fatty acids. *Annales de Zootechnie*. 49: 181–205.
- Chilliard, Y., Glasser, F., Ferlay, A., Bernard, L., Rouel, J., and Doreau, M. 2007. Diet, rumen biohydrogenation and nutritional quality of cow and goat milk fat. *European Journal of Lipid Science and Technology*. 109:828-855.
- Chilliard, Y., and Lamberet, G. 2001. Biochemical characteristics of goat milk lipids and lipolytic system. A comparison with cows and human milk. Effect of lipid supplementation. In: Freund, G. (Ed.), *Goat milk quality, raw material for cheesemaking*. Institut Technique des Produits Laitiers Caprins (ITPLC). Surgères, France, pp71–114.
- Chiofalo, B., Liotta, L., Zumbo, A., and Chiofalo, V. 2004. Administration of olive cake for ewe feeding: Effect on milk yield and composition. *Small Ruminant Research*. 55:169–176.
- Chouinard, P.Y., Corneu, L., Butler, W.R., Chilliard, Y., Drackley, J.K., and Bauman, D.E. 2001. Effect of dietary lipid source on conjugated linoleic acid concentrations in milk fat. *Journal of Dairy Science*. 84: 680–690.
- Claesson, M.J. 2010. Comparison of two next-generation sequencing technologies for resolving highly complex microbiota composition using tandem variable 16S rRNA gene regions. *Nucleic Acids Research*. 38:e200.
- Clark, J.H., Klusmeyer, T.H., and Cameron, M.R. 1992. Microbial protein synthesis and flows of nitrogen fractions to the duodenum of dairy cows. *Journal of Dairy Science*. 75:2304-2323.
- Coakley, M., Barret, E., Murphy, J.J., Ross, R.P., Devery, R., Stanton, C. 2007. Cheese manufacture with milk with elevated conjugated linoleic acid levels caused by dietary manipulation. *Journal of Dairy Science*. 90: 2919-2927.
- Cole, J.R., Chai, B., Farris, R.J., Wang, Q., Kulam, S.A., McGarrell, D.M., Garrity, G.M. and Tiedje, J.M. 2005. The Ribosomal Database Project (RDP-II): sequences and tools for high-throughput rRNA analysis. *Nucleic Acids Research*. 33: D294-D296.
- Cole, J.R., Wang, Q., Cardenas, E., Fish, J., Chai, B., Farris, R.J., Kulam-Syed-Mohideen, A.S., McGarrell, D.M., Marsh, T., and Garrity, G.M. 2009. The Ribosomal Database Project: improved alignments and new tools for rRNA analysis. *Nucleic Acids Research*. 37: D141-D145.
- Collomb, M., Schmid, A., Sieber, R., Wechsler, D., Ryhanen, E.L. 2006. Conjugated linoleic acids in milk fat: Variation and physiological effects. *International Dairy Journal*. 16:1347-1361.

Capítulo 8

- Colwell, R.K., and Coddington, J.A. 1994. Estimating terrestrial biodiversity through extrapolation. *Philosophical Transactions of the Royal Society, London (Series B)* 345:101-118.
- Common Agricultural Policy-PAC. 2012. http://ec.europa.eu/agriculture/publi/capexplained/cap_en.pdf.
- Coomer, J.C., Amos, H.E., Froetschel, M.A., Ragland, K.K., and Williams, C.C. 1993. Effects of supplemental protein source on ruminal fermentation, protein degradation, and amino acid absorption in steers and on growth and feed efficiency in steers and heifers. *Journal of Animal Science*. 71:3078.
- Cosgrove, G.P., Waghorn, G.C., and Anderson, C.B. 2008. The effect of oils fed to sheep on methane production and digestion of ryegrass pasture. *Australian Journal of Experimental Agriculture*. 48: 189–192.
- Counotte, G.H.M., van't Klooster, A.T., van der Kuilen, J., and Prins, R.A. 1979. An analysis of the buffer system in the rumen of dairy cattle. *Journal of Animal Science*. 49: 1536-1544.
- Craig, W.M., Hong, B.J., Broderick, G.A., and Bula, R.J. 1984. In vitro inoculum enriched with particle-associated microorganisms for determining rates of fiber digestion and protein degradation. *Journal of Dairy Science*. 67: 2902-2909.
- Craig, W.M., Broderick, G.A., and Ricker, D.B. 1987. Quantitation of microorganisms associated with the particulate phase of ruminal ingesta. *The Journal of Nutrition*. 117: 56-62.
- Craig-Schmidt, M.C. 2006. World-wide consumption of trans fatty acids. *Atherosclerosis*. Suppl. 7:1-4.
- Culman, S.W., Gauch, H.G., Blackwood, C.B., and Thies, J.E. 2008. Analysis of T-RFLP data using analysis of variance and ordination methods: A comparative study. *Journal of Microbiological Methods*. 75: 55-63.
- Cunha, I.S., Barreto, C.C., Costa, O.Y., Bomfim, M., Castro, A.P., Kruger, R.H., and Quirino, B.F. 2011. Bacteria and Archaea community structure in the rumen microbiome of goats (*Capra hircus*) from the semiarid region of Brazil. *Anaerobe*. 17:118-124.
- Curtis, T.P., Sloan, W.T. and Scannell, J.W. 2002. Estimating prokaryotic diversity and its limits. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 99: 10494-10499.
- Czerkawski, J.W. 1986. Degradation of solid feeds in the rumen: spatial distribution of microbial activity and its consequences. In: *Control of Digestion and Metabolism in Ruminants*, 158-172 (Eds L. P. Miligan, N. L. Grovum and A. Dobson). Nueva Jersey, EEUU: Prentice-Hall.
- Das A., Ghosh S.K. 2007. Effect of partial replacement of concentrates with jackfruit (*Artocarpus heterophyllus*) leaves on growth performance of kids grazing on native pasture of Tripura, India. *Small Ruminant Research*. 67:36-44.
- Dehority, B.A., and Orpin, C.G. 1997. Development of, and natural fluctuations in, rumen microbial population. In: *The Rumen Microbial Ecosystem.*, 196-245 (Eds P. N. Hobson and C. S. Stewart). Londres, Reino Unido: Chapman and Hall.

- Dehority, B.A. 2003. *Rumen Microbiology*. Nottingham, Reino Unido: Nottingham University Press.
- Delage, J., Morand-Fehr, P.M. 1967. Influence des lipides alimentaires sur la sécrétion des acides gras par la mamelle de chèvre. I. influence de la teneur du régime en lipides sur le taux butyreux du lait et sa composition en acides gras. *Reproduction and Nutrition Development*. 7: 437-444.
- Denek, N., and Can, A. 2006. Feeding value of wet tomato pomace ensiled with wheat straw and wheat grain for Awassi sheep. *Small Ruminant Research*. 65: 260-265.
- Deng, W., Xi, D., Mao, H., and Wanapat, M. 2008. The use of molecular techniques based on ribosomal RNA and DNA for rumen microbial ecosystem studies: a review. *Molecular Biology Reports*. 35: 265-274.
- Dehority, B.E., Tirabasso, P.A., and Grifo, Jr.A.P. 1989. Most-probable-number procedures for enumerating ruminal bacteria, including the simultaneous estimation of total and cellulolytic numbers in one medium. *Applied and Environmental Microbiology*. 55:2789-2792.
- Dehority, B.A. 2003. *Rumen Microbiology*. Nottingham Univ. Press, Nottingham, UK.
- Denman, S.E., and McSweeney, C.S. 2005. Quantitative (real-time) PCR. Methods in *Gut Microbial Ecology for Ruminants* (Makkar HPS and McSweeney CS, Eds), pp. 105-115. Springer, Dordrecht, The Netherlands.
- Denman, S.E., Tomkins, N.W., and McSweeney, C.S. 2007. Quantitation and diversity analysis of ruminal methanogenic populations in response to the antimethanogenic compound bromochloromethane. *FEMS Microbiology Ecology*. 62: 313-322.
- DePeters, E.J., Taylor, S.J., Finley, C.M., and Samula, T.R. 1987. Dietary fat and nitrogen composition of milk from lactating cows. *Journal of Dairy Science*. 70:1192.
- DePeters, E.J., and Cant, J.P. 1992. Nutritional factors influencing the nitrogen composition of bovine milk: A review. *Journal of Dairy Science*. 75:2043-2070.
- 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. *Journal of Animal Science*. 78:1667-1676.
- Devant, M., Ferret, A., Calsamiglia, S., Casals, R., and Gasa, J. 2001. Effect of nitrogen source in high-concentrate, low-protein beef cattle diets on microbial fermentation studied in vivo and in vitro. *Journal of Animal Science*. 79:1944-1953.
- Devendra, C. 1989. Comparative aspects of digestive physiology and nutrition in goats and sheep. In: C. Devendra and E. Imaizumi (Editors), *Ruminant Physiology and Nutrition in Asia*. Jap. Soc. Zootech. Sci., Sendai, Japan, pp. 45-60.
- Dewhurst, R.J., Davies, D.R., and Merry, R.J. 2000. Microbial protein supply from the rumen. *Animal Feed Science and Technology*. 85:1-21.
- Dewhurst, R.J., Shingfield, K.J., Lee, M.R.F., and Scollan, N.D. 2006. Increasing the concentrations of beneficial polyunsaturated fatty acids in milk produced by dairy cows in high-forage systems. *Animal Feed Science and Technology*. 131:168-206.

Capítulo 8

- Dhiman, T.R., Satter, L.D., Pariza, M.W., Galli, M.P., Albright, K., and Tolosa, M.X. 2000. Conjugated linoleic acid (CLA) content of milk from cows offered diets rich in linoleic and linolenic acid. *Journal of Dairy Science*. 83: 1016-1027.
- Di, H.J., and Cameron, K.C. 2007. Nitrate leaching losses and pasture yields as affected by different rates of animal urine nitrogen returns and application of a nitrification inhibitor—A lysimeter study. *Nutrient Cycling in Agroecosystems*. 79:281–290.
- Di Francia, A., De Rosa, G., Masucci, F., Romano, R., and Grasso, F. 2004. Effetto dell'impiego alimentare del residuo industriale del passato di pomodoro sulle prestazioni produttive di pecore di razza Comisana. In: *Proc. 16th Natl. Congr. SIPAOC*, Siena, Italy, p. 271 (in Italian).
- Dijkstra, J. 1994. Production and absorption of volatile fatty acids in the rumen. *Livestock Production Science*. 39:61-69.
- Dijkstra, J., France, J., and Davies, D.R. 1998. Different mathematical approaches to estimating microbial protein supply in ruminants. *Journal of Dairy Science*. 81: 3370-3384.
- Dixon, R.M., and Stockdale, C.R. 1999. Associative effects between forages and grains: consequences for feed utilisation. *Australian Journal of Agricultural Research*. 50:757-774.
- Dohme, F., Machmüller, A., Wasserfallen, A., and Kreuzer, M. 2000. Comparative efficiency of various fats rich in medium-chain fatty acids to suppress ruminal methanogenesis as measured with RUSITEC. *Canadian Journal of Animal Science*. 80: 473–482.
- Dohme, F., Machmüller, A., Wasserfallen, A., and Kreuzer, M. 2001. Ruminal methanogenesis as influenced by individual fatty acids supplemented to complete ruminant diets. *Letters in Applied Microbiology*. 32:47–51.
- Domingue, B.M.F., Dellow, D.W., Wilson, P.R., and Barry, T.N. 1991. Nitrogen metabolism, rumen fermentation and water absorption in red deer, goats and sheep. *New Zealand Journal of Agriculture Research*. 34:391-400.
- Doreau, M., and Ferlay, A. 1994. Digestion and utilisation of fatty acids by ruminants. *Animal Feed Science and Technology*. 45: 379-396.
- Dulphy, J.P., Kouassi, A., and Bienaime, A. 1982. Étude de la valeur alimentaire des pailles de céréales traitées ou non à la soude. II. Influence de la nature du complément énergétique. *Annales de Zootechnie*. 31:215-232.
- Dulphy, J.P., Breton, J., Louyot, J.M., and Bienaime, A. 1983. Étude de la valeur alimentaire des pailles de céréales traitées ou non à la soude. III. Influence du niveau d'apport d'aliment concentré. *Annales de Zootechnie*. 32: 53-80.
- Dumont, M.G., and Murrell, J.C. 2005. Stable isotope probing – linking microbial identity to function. *Nature Reviews in Microbiology*. 3: 499–504.
- Dunbar, J., Barns, S.M., Ticknor, L.O., and Kuske, C.R. 2002. Empirical and theoretical bacterial diversity in four arizona soils. *Applied and Environmental Microbiology*. 68: 3035-3045.
- Dunkley, W.L., Smith, N.E., and Franke, A.A. 1977. Effects of feeding protected tallow on composition of milk and milk fat. *Journal of Dairy Science*. 60:1683.

- Dung, N.T., Mui, N.T., and Ledin, I. 2005. Effect of replacing a commercial concentrate with cassava hay (*Manihot esculenta Crantz*) on the performance of growing goats. *Animal Feed Science and Technology*. 119:271-281.
- Eckard, R.J., Grainger, C., and de Klein, C.A.M. 2010. Options for the abatement of methane and nitrous oxide from ruminant production: a review. *Livestock Science*. 130: 47–56.
- Edionwe, A.O., and Owen, F.G. 1989. Relation of intake to digestibility of diets containing soyhulls and distillers dried grains. *Journal of Dairy Science*. 72: 1786-1792.
- Edwards, J.E., McEwan, N.R., Travis, A.J., and Wallace, R.J. 2004. 16S rDNA library-based analysis of ruminal bacterial diversity. *Antonie van Leeuwenhoek*. 86: 263-281.
- El Hag, M.G., Al-Merza, M.A., and Salti, B.A. 2002. Growth in the Sultanate of Oman of small ruminants given date byproducts-urea multinutrient blocks. *Asian Australasian Journal Animal*. 15: 671–674.
- Elliott, R.C., and Topps, J.H. 1963. Nitrogen metabolism of African cattle fed diets with an adequate energy, low protein content. *Nature*. 197:668-670.
- Ellis, W.C., and Bleichner, K.L. 1969. Synthesis and digestion of nucleic acids in gastrointestinal tract of sheep. *Journal of Animal Science*. 29: 157.
- Ellis, J.L., Kebreab, E., Odongo, N.E., McBride, B.W., Okine, E.K., and France, J. 2007. Prediction of methane production from dairy and beef cattle. *Journal of Dairy Science*. 90: 3456–3467.
- Elwood, P.C., Givens, D.I., Beswick, A.D., Fehily, A.M., Pickering, J.E., and Gallacher, J. 2008. The survival advantage of milk and dairy consumption: an overview of evidence from cohort studies of vascular diseases, diabetes and cancer. *Journal of the American College of Nutrition*. 27:723S-734S.
- Emery, R.S. 1978. Feeding for increased milk protein. *Journal of Dairy Science*. 61:825–828.
- Emery, R.S. 1988. Milk fat depression and the influence of diet on milk composition. *Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice*. 4: 289–305.
- Escuder, A., Fernández, G., and Capote, J. 2006. Characterization of Palmera dairy goat production systems. *Options Méditerranéennes*. A-70: 95–100.
- Eugène, M., Archimède, H., and Sauvant, D. 2004a. Quantitative meta-analysis on the effects of defaunation of the rumen on growth, intake and digestion in ruminants. *Livestock Production Science*. 85: 81-97.
- Eugène, M., Archimède, H., Weisbecker, J.L., Periacarpin, F., Saminadin, G., and Sauvant, D. 2004b. Effects of defaunation on digestion and growth, in sheep receiving a mixed diet (fresh *Digitaria decumbens* grass and concentrate) at four protein to energy ratios. *Animal Research*. 53: 111-125.
- Eugène, M., Massé, D., Chiquette, J., and Benchaar, C. 2008. Metaanalysis on the effects of lipid supplementation on methane production in lactating dairy cows. *Canadian Journal of Animal Science*. 88: 331–334.
- FAOSTAT, 2010. Bases de datos de la FAO. Producción ganadera. <http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>.

Capítulo 8

- Faverdin, P., Dulphy, J.P., Coulon, J.B., Vérité, R., Garel, J.P., Rouel, J., and Marquis, B. 1991. Substitution of roughage by concentrates for dairy cows. *Livestock Production Science*. 27:137-156.
- Fazlollah-Ghoreishi, S., Pirmohammadi, R., and Teimouri-Yansari, A. 2007. Effects of ensiled apple pomace on milk yield, milk composition and DM intake of Holstein dairy cows. *Journal of Animal and Veterinary Advances*. 6: 1074-1078.
- Fegeros, K., Zervas, G., Stamouli, S., and Apostolaki, E. 1995. Nutritive value of dried citrus pulp and its effect on milk yield and milk composition of lactating ewes. *Journal of Dairy Science*. 78: 1116–1121.
- Fields, M.W., Mallik, S., and Russell, J.B. 2000. Fibrobacter succinogenes S85 ferments ball-milled cellulose as fast as cellobiose until cellulose surface area is limiting. *Applied Microbiology and Biotechnology* 54: 570-574.
- 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: 157–161.
- Flint, H.J., Bayer, E.A., Rincon, M.T., Lamed, R., and White, B.A. 2008. Polysaccharide utilization by gut bacteria: potential for new insights from genomic analysis. *Nature Reviews Microbiology*. 6: 121-131.
- Firkins, J.L. 1996. Maximizing microbial protein synthesis in the rumen. *The Journal of Nutrition*. 126:1347-1354S.
- Firkins, J.L., Allen, M.S., Oldick, B.S., and St-Pierre, N.R. 1998. Modeling ruminal digestibility of carbohydrates and microbial protein flow to the duodenum. *Journal of Dairy Science*. 81:3350-3369.
- Firkins, J.L., and Yu, Z. 2006. Characterisation and quantification of the microbial populations of the rumen. In: *Ruminant Physiology, Digestion, Metabolism and Impact of Nutrition on Gene Expression, Immunology and Stress*, 19-54 (Eds K. Sejrsen, T. Hvelplund and M. O. Nielsen). Wageningen, Países Bajos: Wageningen Academic Publishers.
- Foley, P.A., Kenny, D.A., Callan, J.J., Boland, T.M., and O'Mara, F.P. 2009. Effect of DL-malic acid supplementation on feed intake, methane emission, and rumen fermentation in beef cattle. *Journal of Animal Science*. 87: 1048– 1057.
- Fondevila, M., Guada, J., Gasa, J., and Castrillo, C. 1994. Tomato pomace as a protein supplement for growing lambs. *Small Ruminant Research*. 13: 117-126.
- Fonty, G., Gouet, P., Jouany, J.P., and Senaud, J. 1987. Establishment of the microflora and anaerobic fungi in the rumen of lambs. *Journal of General Microbiology*. 133: 1835-1843.
- Food, Agriculture Organization-FAO. 2003. *World agriculture: towards 2015/2030*. An FAO perspective. FAO, Rome, p 97.
- Food, Agriculture Organization-FAO. 2011. *Crop Prospects and Food Situation*, N° 4, December 2011. <http://www.fao.org/giews/english/cpfs/index.htm>.
- Forsberg, C.W., and Lam, K. 1977. Use of adenosine 5'-triphosphate as an indicator of the microbiota biomass in rumen contents. *Applied and Environmental Microbiology*. 33: 528-537.

- Forster, P., Ramaswamy, V., Artaxo, P., Berntsen, T., Betts, R., Fahey, D.W., Haywood, J., Lean, J., Lowe, D.C., Myhre, G., Nganga, J., Prinn, R., Raga, G., Schulz, M., and Van Dorland, R. 2007. Changes in atmospheric constituents and in radiative forcing. In: *Solomon, S., Qin, D., Manning, M., Chen, Z., Marquis, M., Averyt, K.B., Tignor, M., Miller, H.L. (Eds.), Climate Change 2007: The Physical Science Basis*. Contribution of Working Group I to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- France, J., Siddons, R.C. 1993. Volatile fatty acids production. In: *Aspects of Ruminant Digestion and Metabolism*. (Eds. J.M. Forbes and J. France). CAB International. Wallingford, UK., pp 107- 121.
- Frey, J.C., Angert, E.R., and Pell, A.N. 2006. Assessment of biases associated with profiling simple, model communities using terminal-restriction fragment length polymorphism-based analyses. *Journal of Microbiological Methods*. 67: 9-19.
- Fujihara, T., Ørskov, E.R., Reeds, P.J. 1987. The effect of protein infusion on urinary excretion of purine derivatives in ruminants nourished by intragastric nutrition. *Journal of Agriculture Science*. 109:7-12.
- Fujihara, T., Shem, M.N., and Nakamura, K. 2005. Effect of dietary energy levels on the urinary excretion of purine derivatives in sheep. *Animal Science Journal* 76: 441-445.
- Fujita, T., Kajita, M., and Sano, H. 2006. Responses of whole body protein synthesis, nitrogen retention and glucose kinetics to supplemental starch in goats. *Comparative Biochemistry and Physiology*. B Biochem. Mol. Chem. 144:180–187.
- 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: 928-937.
- García-Unciti, M.S. 1996. Utilidad terapéutica de los triglicéridos de cadena media (MCT). Dietas cetogénicas en la epilepsia infantil. *NutriciónClínica*. 16: 7–35.
- Gasa, J., Castrillo, C., Baucells, M.D., and Guada, J.A. 1989. By-products from the canning industry as feedstuff for ruminants: Digestibility and its prediction from chemical composition and laboratory bioassays. *Animal Feed Science and Technology*. 25: 67-77.
- Gasmi-Boubaker., Kayouli, C., and Buldgen, A. 2006a. Effect of feed block supply on the ruminal ecosystem of goats grazing shrub land in Tunisia. *Animal Feed Science and Technology*. 127: 1-12.
- Gasmi-Boubaker., Kayouli, C., and Buldgen, A. 2006b. Feed blocks as a supplement for goat kids grazing natural Tunisian rangeland during the dry season. *Animal Feed Science and Technology*. 126: 31-41.
- Gaston, K.J. 1996. *Biodiversity: A Biology of Numbers and Difference*. Blackwell Science, Oxford.
- Getachew, G., Robinson, P.H., DePeters, E.J., and Taylor, S.J. 2004. Relationships between chemical compositions, dry matter degradation and in vitro gas

Capítulo 8

- production of several ruminant feeds. *Animal Feed Science and Technology*. 111: 57-71.
- Giesecke, D., Stangassinger, M., and Tiemeyer, W. 1984. Nucleic acid digestion and urinary purines metabolites in sheep nourished by intragastric infusion. *Canadian Journal of Animal Science*. 64: 144–145.
- Giger, S. 1987. Influence de la composition de l'aliment concentré sur la valeur alimentaire des rations destinées au ruminant laitier. *Tesis Doctoral*. Institut Nationale Agronomique, Paris-Grignon.
- Giger, S., Sauvant, D., Durand, M., and Hervieu, J. 1988. Influence de la nature de l'aliment concentré sur quelques paramètres de la digestion dans le rumen. *Reproduction and Nutrition Développement*. 28: 117-118.
- Gilbert, W., and Maxam, A. 1973. The nucleotide sequence of the lac operator. *PNAS*. 70: 3581–3584.
- Giraldo, L.A., Tejido, M.L., Ranilla, M.J., Ramos, S., and Carro, M.D. 2008. Influence of direct-fed fibrolytic enzymes on diet digestibility and ruminal activity in sheep fed a grass hay-based diet. *Journal of Animal Science*. 86:1617-1623.
- Givens, D.I. 2005. The role of animal nutrition in improving the nutritive value of animal-derived foods in relation to chronic disease. *Proceedings of the Nutrition Society*. 64: 395-402.
- Goetsch, A.L., Detweiler, G., Sahlu, T., Puchala, R., and Dawson, L.J. 2001. Dairy goat performance with different dietary concentrate levels in late lactation. *Small Ruminant Research*. 41:117-125.
- Gómez-Cortés, P., Frutos, P., Mantecón, A.R., Juárez, M., de la Fuente, M.A., Hervás, G. 2008. Milk production, conjugated linoleic acid content, and in vitro ruminal fermentation in response to high levels of soybean oil in dairy ewe diet. *Journal of Dairy Science*. 91: 1560-1569.
- Gonzalez, J.M., Portillo, M.C., Belda-Ferre, P., and Mira, A. 2012. Amplification by PCR artificially reduces the proportion of the rare biosphere in microbial communities. *PloS one*. 7. doi:10.1371/journal.pone.0029973.
- Gonzalez-Ronquillo, M., Balcells, J., Guada, J.A., and Vicente, F. 2003. Purine derivative excretion in dairy cows: Endogenous excretion and the effect of exogenous nucleic acid supply. *Journal of Dairy Science*. 86:1282-1291.
- González-Ronquillo, M., Balcells, J., Belenguer, A., Castrillo, C., and Mota, M. 2004. A comparison of purine derivatives excretion with conventional methods as indices of microbial yield in dairy cows. *Journal of Dairy Science*. 87:2211-2221.
- Gordon, F.J., and Forbes, T.J. 1971. Effect of fibre level in the diet of the dairy cow on milk yield and composition. *Journal of Dairy Research*. 38:381.
- Grainger, C., Clarke, T., McGinn, S.M., Auld, M.J., Beauchemin, K.A., Hannah, M.C., Waghorn, G.C., Clark, H., and Eckard, R.J. 2007. Methane emissions from dairy cows measured using the sulfur hexafluoride (SF6) tracer and chamber techniques. *Journal of Dairy Science*. 90: 2755-2766.
- Grainger, C., Williams, R., Clarke, T., Wright, A.D.G., and Eckard, R.J. 2010. Supplementation with whole cottonseed causes long-term reduction of methane

- emissions from lactating dairy cows offered a forage and cereal grain diet. *Journal of Dairy Science*. 93: 2612–2619.
- Grant, A., Ogilvie, L.A., Blackwood, C.B., Marsh, T., Kim, S.H., and Paul, E.A. 2003. Letter to the editor: Terminal restriction fragment length polymorphism data analysis. *Applied and Environmental Microbiology*. 69:6342-6343.
- Grasser, L.A., Fadel, J.G., Garnet, I., and DePeters, E.J. 1995. Quantity and economic importance of nine selected by-products used in California dairy rations. *Journal of Dairy Science*. 78: 962-971.
- Greenwood, S.L., Edwards, G.R., and Harrison, R. 2012. Short communication: Supplementing grape marc to cows fed a pasture-based diet as a method to alter nitrogen partitioning and excretion. *Journal of Dairy Science*. 95: 755-758.
- Gu, M.J., Alam, M.J., Kim, S.H., Jeon, C.O., Chang, M.B., Oh, Y.K., and Lee, S.C. 2011. Analysis of methanogenic archaeal communities of rumen fluid and rumen particles from Korean black goats. *Animal Science Journal*. 82: 663-672.
- Guan, H., Wittenberg, K.M., Ominski, K.H., and Krause, D.O. 2006. Efficacy of ionophores in cattle diets for mitigation of enteric methane. *Journal of Animal Science*. 84: 1896–1906.
- Guérin, H., and Dulphy, J.P. 1984. Influence de l'apport complémentaire de maïs, de pulpe de bet-terave ou de mélasse sur la valeur alimentaire d'un foin. *Annales de Zootechnie*. 33:509-532.
- Guo, Y.Q., Liu, J.X., Lu, Y., Zhu, W.Y., Denman, S.E., and McSweeney, C.S. 2008. Effect of tea saponin on methanogenesis, microbial community structure and expression of mcrA gene, in cultures of rumen micro-organisms. *Letters in Applied Microbiology*. 47: 421–426.
- Ha, Y. L., Grimm, N.K., and Pariza, M.W. 1987. Anticarcinogens from fried ground-beef - Heat- altered derivatives of linoleic-acid. *Carcinogenesis*. 8:1881-1887.
- Hadjipanayiotou, M. 1999. Feeding ensiled crude olive cake to lactating Chios ewes, Damascus goats and Friesian cows. *Livestock Production Science*. 59: 61–66.
- Hadjipanayiotou, M., and Antoniou, T. 1983. A comparison of rumen fermentation patterns in sheep and goats given a variety of diets. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 34:1319-1322.
- Haenlein, G.F.W. 1992. Role of goat meat and milk in human nutrition. In: *Proc. 5th International Conference of Goats*, New Delhi, India, 1-8 March, ICAR Publishers, New Delhi. 2:575-580.
- Haenlein, G.F.W. 1996. Nutritional value of dairy products of ewes and goats milk. *International Journal of Animal Science*. 11: 395–411.
- Haenlein, G.F.W. 2001. Past, present, and future perspectives of small ruminant dairy research. *Journal of Dairy Science*. 84:2097–2115.
- Haenlein, G.F.W., 2004. Goat milk in human nutrition. *Small Ruminant Research*. 51: 155–163.
- Handelsman, J. 2004. Metagenomics: Application of genomics to uncultured microorganisms. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 68:669–685.
- Hansma, H.G. 1991. Progress in sequencing deoxyribonucleic acid with an atomic force microscope. *Journal of Vacuum Science and Technology*. B9:1282–1284.

Capítulo 8

- Harvatine, K.J., Allen, M.S. 2006. Fat supplements affect fractional rates of ruminal fatty acid biohydrogenation and passage in dairy cows. *Journal of Nutrition*. 136:677-685.
- Harwood, C.S., and Canale-Parola, E. 1981. Adenosine 5-triphosphate yielding pathways of branched-chain amino acids fermentation by a marine spirochete. *Journal of Bacteriology*. 148: 117-122.
- Hays, C., Duhamel, C., Cattoir, V., and Bonhomme, J. 2011. Rapid and accurate identification of species belonging to the *Candida parapsilosis* complex by real-time PCR and melting curve analysis. *Journal of Medical Microbiology*. 60: 477-480.
- Hegarty, R.S. 1999. Reducing rumen methane emissions through elimination of rumen protozoa. *Australian Journal of Agricultural Research*. 50:1321–1327.
- Hegarty, R.S., Bird, S.H., Vanselow, B.A., and Woodgate, R. 2008. Effects of the absence of protozoa from birth or from weaning on the growth and methane production of lambs. *British Journal of Nutrition*. 100: 1220–1227.
- Hervás, G., Luna, P., Mantecón, A.R., Castañares, N., de la Fuente, M.A., Juárez, M., and Frutos, P. 2008. Effect of diet supplementation with sunflower oil on milk production, fatty acid profile and ruminal fermentation in lactating dairy ewes. *Journal of Dairy Research*. 75:399-405.
- Hespell, R.B., Akin, D.E., and Dehority, B.A. 1997. Bacteria, fungi, and protozoa of the rumen. In: *Gastrointestinal Microbiology v 2: Gastrointestinal Microbes and Host Interactions*. (Eds R. I. Mackie, B. A. White and R. E. Isaacson). New York, USA. Chapman and Hall Vol. 2: 59–141.
- Hill, G.T., Mitkowski, N.A., Aldrich-Wolfe, L., Emele, L.R., Jurkonie, D.D., Ficke, A., Maldonado-Ramirez, S., Lynch, S.T., and Nelson, E.B. 2000. Methods for assessing the composition and diversity of soil microbial communities. *Applied Soil Ecology*. 15:25-36.
- Hill, T.C.J., Walsh, K.A., Harris, J.A., and Moffett, B.F. 2003. Using ecological diversity measure with bacterial communities. *FEMS Microbiology Ecology*. 43:1–11.
- Hillman, K., Lloyd, D., and Williams, A.G. 1988. Interactions between the methanogen *Methanosarcina barkeri* and rumen holotrich ciliate protozoa. *Letters in Applied Microbiology*. 7: 49-53.
- Hillman, D.L.K., Yarlett, N., and Williams, A.G. 1989. Hydrogen production by rumen holotrich protozoa: effects of oxygen and implications for metabolic control by in situ conditions. *Journal of Eukaryotic Microbiology*. 36: 205-213.
- Hiltner, P., and Dehority, B.A. 1983. Effect of soluble carbohydrates on digestion of cellulose by pure cultures of rumen bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*. 46: 642-648.
- Hindrichsen, I.K., Wettstein, H.R., Machmüller, A., and Kreuzer, M. 2006. Methane emission, nutrient degradation and nitrogen turnover in dairy cows and their slurry at different milk production scenarios with and without concentrate supplementation. *Agriculture, Ecosystems and Environment*. 113:150–161.

- Hironaka, R., Mathison, G.W., Kerrigan, B.K., and Vlach, L. 1996. The effect of pelleting of alfalfa hay on methane production and digestibility by steers. *Science of the Total Environment*. 180: 2211-2227.
- Hobson, P.N., and Stewart, C.S. 1997. *The rumen microbial ecosystem*. Springer. Blackie, Londres.
- Holter, J.B., and Young, A.J. 1992. Methane prediction in dry and lactating Holstein cows. *Journal of Dairy Science*. 75: 2165–2171.
- Holtshausen, L., Chaves, A.V., and Beauchemin, K.A. 2009. Feeding saponin-containing *Yucca schidigera* and *Quillaja saponaria* to decrease enteric methane production in dairy cows. *Journal of Dairy Science*. 92: 2809–2821.
- Hong, S.H., Bunge, J., Jeon, S.O., and Epstein, S.S. 2006. Predicting microbial species richness. *PNAS*. 103:117–122.
- Hook, S.E., Northwood, K.S., Wright, A.D.G., and McBride, B.W. 2009. Long-term monensin supplementation does not significantly affect the quantity or diversity of methanogens in the rumen of the lactating dairy cow. *Applied and Environmental Microbiology*. 75: 374-380.
- Hook, S.E., Wright, A.D.G., and McBride, B.W. 2010. Methanogens: Methane Producers of the Rumen and Mitigation Strategies. *Archaea*. doi:10.1155/2010/945785.
- Hoover, W.H. 1978. Digestion and absorption in the hindgut of ruminants. *Journal of Animal Science*. 46:1789-1799.
- Hoover, W.H. 1986. Chemical factors involved in ruminal fiber digestion. *Journal of Dairy Science*. 69:2755-2766.
- Hugenholtz, P., and Huber, T. 2003. Chimeric 16S rDNA sequences of diverse origin are accumulating in the public databases. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 53:289–293.
- Hughes, J.B., Hellmann, J.J., Ricketts, T.H., and Bohannan, B.J.M. 2001. Counting the uncountable: statistical approaches to estimating microbial diversity. *Applied and Environmental Microbiology*. 67:4399–4406.
- Hume, I.D. 1970. Synthesis of microbial protein in the rumen. III: The effect of dietary protein. *Australian Journal of Agricultural Research*. 21: 304-314.
- Hungate, R.E. 1966. *The Rumen and its Microbes*. Nueva York, EEUU: Academic Press.
- Hungate, R.E., Smith, W., Bauchop, T., Yu, I., and Rabinowitz, J.C. 1970. Formate as an intermediate in the rumen fermentation. *Journal of Bacteriology*. 102: 384–397.
- Hungate, R.E., and Macy, J. 1973. The roll-tube method for cultivation of strict anaerobes. *Bulletins from the Ecological Research Committee*. 17: 123-126
- Hvelplund, T., and Madsen, J. 1985. Amino acid passage to the small intestine in dairy cows compared with estimates of microbial protein and undegraded dietary protein from analysis on the feed. *Acta Agriculturae Scandinavica* 25: 21-32.
- Hyman, E.D. 1988. A new method of sequencing DNA. *Analytical Biochemistry*. 174: 423–436.

Capítulo 8

- INRA, 1978. *Alimentation des ruminants*. (R. Jarrige ed). Institute National de la Recherche Agronomique. Versailles, Francia.
- INRA, 1988. Jarrige, R. (Ed.), *Alimentation des Bovins, Ovins et Caprins*. INRA, Paris, 476 pp.
- Isac, M.D., García, M.A., Aguilera, J.F., and Molina-Alcaide, E. 1994. A comparative study of nutrient digestibility, kinetics of digestion and passage and rumen fermentation pattern in goats and sheep offered medium quality forages at the maintenance level of feeding. *Archiv fur Tierernahrung*. 46:37-50.
- Islam, M., Abe, H., Hayashi, Y., and Terada, F. 2000. Effects of feeding Italian ryegrass with corn on rumen environment, nutrient digestibility, methane emission, and energy and nitrogen utilization at two intake levels by. *Small Ruminant Research*. 38: 165-174.
- Jahreis, G., Kraft, J., Tischendorf, F., Schöne, F., and von Loeffelholz, C. 2000. Conjugated linoleic acids: physiological effects in animal and man with special regard to body composition. *European Journal of Lipid Science and Technology*. 102: 695-703.
- Janssen, P.H., and Kirs, M., 2008. Structure of the archaeal community of the rumen. *Applied and Environmental Microbiology*. 74:3619-3625.
- Janssen, P.H. 2010. Influence of hydrogen on rumen methane formation and fermentation balances through microbial growth kinetics and fermentation thermodynamics. *Animal Feed Science and Technology*. 160:1–22.
- Jenkins, T.C., and McGuire, M.A. 2006. Major advances in nutrition: impact on milk composition. *Journal of Dairy Science*. 89: 1302-10.
- Jensen, R.G. 2002. The composition of bovine milk lipids: January 1995 to December 2000. *Journal of Dairy Science*. 85:295-350.
- Jeon, S.O., Bunge, J., Stoeck, T., Barger, K.J.A., Hong, S.H., and Epstein, S.S. 2006. Synthetic statistical approach reveals a high degree of richness of microbial eukaryotes in an anoxic water column. *Applied and Environmental Microbiology*. 72:6578–6583.
- Joblin, K.N., Matsui, H., Naylor, G.E., and Ushida, K. 2002. Degradation of fresh ryegrass by methanogenic co-cultures of ruminal fungi grown in the presence or absence of *Fibrobacter succinogenes*. *Current Microbiology*. 45: 46–53.
- Johnson, K.A., and Johnson, D.E. 1995. Methane emissions from cattle Methane Emissions from Cattle. *Journal of Animal Science*. 73: 2483-2492.
- Jordan, E., Lovett, D.K., Monahan, F.J., Callan, J., Flynn, B., and P.O'Mara, F. 2006a. Effect of refined coconut oil or copra meal on methane output and on intake and performance of beef heifers. *Journal of Animal Science*. 84: 162–170.
- Jordan, E., Kenny, D., Hawkins M., Malone, R., Lovett, D.K., and O'Mara, F.P. 2006b. Effect of refined soy oil or whole soybeans on intake, methane output, and performance of young bulls. *Journal of Animal Science*. 84: 2418–2425.
- Jouany, J.P., Papon, Y., Morgavi, D.P. and Doreau, M. 2008. Linseed oil and a combination of sunflower oil and malic acid decrease rumen methane emissions in vitro., In: Rowlinson, P., Steele, M. and Nefzaoui, A., eds, *Livestock and Global Climate Change*. Cambridge University Press, Cambridge, UK:140–143.

- Kahn, L.P., and Nolan, J.V. 2001. Kinetics of allantoin metabolism in sheep. *British Journal of Animal Nutrition*. 84: 629-634.
- Kajikawa, H., Hai, J., Terada, F., and Suga, T. 2003. Operation and characteristics of Newly Improved and Marketable Artificial Rumen (Rusitec). *Memoirs of National Institute of Livestock and Grassland Science*. No. 2:49.
- Kang-Meznarich, J.H., and Broderick, G.A. 1981. Effects of incremental urea supplementation on ruminal ammonia concentration and bacterial protein formation. *Journal of Animal Science*. 51:422-431.
- Kanz, C. 2005. The EMBL nucleotide sequence database. *Nucleic Acids Research*. 33: D29-D33.
- Karnati, S.K.R., Yu, Z., Sylvester, J.T., Dehority, B.A., Morrison, M. and Firkins, J.L. 2003. Technical note: Specific PCR amplification of protozoal 18S rDNA sequences from DNA extracted from ruminal samples of cows. *Journal of Animal Science*. 81: 812-815.
- Kaur, R., Nandra, K.S., Garcia, S.C., Fulkerson, W.J., and Horadagoda, A. 2008. Efficiency of utilisation of different diets with contrasting forages and concentrate when fed to sheep in a discontinuous feeding pattern. *Livestock Science*. 119: 77-86.
- Kawas, J.R., Lopes, J., Danelon, D.L., and Lu, C.D. 1991. Influence of forage-to-concentrate ratios on intake, digestibility, chewing and milk production of dairy goats. *Small Ruminant Research*. 4:11-18.
- Keady, T.W.J., and Mayne, C.S. 2001. The effects of concentrate energy source on feed intake and rumen fermentation parameters of dairy cows offered a range of grass silages. *Animal Feed Science and Technology*. 90:117-129.
- Kebreab, E., Clark, K., Wagner-Riddle, and France, J. 2006. Methane and nitrous oxide emissions from Canadian agriculture. A review. *Canadian Journal of Animal Science*. 86: 135-158.
- Khalili, H., and Sairanen, A. 2000. Effect of concentrate type on rumen fermentation and milk production of cows at pasture. *Animal Feed Science and Technology*. 84:199-212.
- Khampa, S., Chaowarat, P., Koatdoke, U., Singhalert, R., and Wanapat, M. 2009. Manipulation of rumen ecology by malate and cassava hay in high-quality feed block in dairy steers. *Pakistan Journal of Nutrition*. 8:814-817.
- Khiaosa-Ard, R., Klevenhusen, F., Soliva, C.R., Kreuzer, M., and Leiber, F. 2010. Transfer of linoleic and linolenic acid from feed to milk in cows fed isoenergetic diets differing in proportion and origin of concentrates and roughages. *Journal of Dairy Research*. 77:331-336.
- Khrapko, K.R. 1989. An oligonucleotide hybridization approach to DNA sequencing. *FEBS Letters*. 256: 118-122
- Kim, K.S., Ko, K.S., Chang, M.W., Hahn, T.W., Hong, S.K., and Kook, Y.H. 2003. Use of *rpoB* sequences for phylogenetic study of *Mycoplasma* species. *FEMS Microbiology Letters*. 226: 299-305.
- Kim, E.J., Huws, S.A., Lee, M.R.F., Wood, J.D., Muetzel, S.M., Wallace, R.J., and Scollan, N.D. 2008. Fish oil increases the duodenal flow of long chain

Capítulo 8

- polyunsaturated fatty acids and *trans*-11 18:1 and decreases 18:0 in steers via changes in the rumen bacterial community. *Journal of Nutrition*. 138:889-896.
- Kim, M., Morrison, M., and Yu, Z. 2010. Evaluation of different partial 16S rRNA gene sequence regions for phylogenetic analysis of microbiomes. *Journal of Microbiological Methods*. 84: 81-87.
- Kim, M., Morrison, M., and Yu, Z. 2011. Status of the phylogenetic diversity census of ruminal microbiomes. *FEMS Microbiology Ecology*. 76:49-63. doi:10.1111/j.1574-6941.2010.01029.x
- Kimura, M. 1968. Evolutionary rate at the molecular level. *Nature*. 217: 624-626.
- Klieve, A.V., and Bauchop, T. 1988. Morphological diversity of ruminal bacteriophages from sheep and cattle. *Applied and Environmental Microbiology*. 54: 1637-1641.
- Klieve, A.V., and Swain, R.A. 1993. Estimation of ruminal bacteriophage numbers by pulsed-field gel electrophoresis and laser densitometry. *Applied and Environmental Microbiology*. 59:2299-2303.
- Kocherginskaya, S.A., Aminov, R.I., and White, B.A. 2001. Analysis of the rumen bacterial diversity under two different diet conditions using denaturing gradient gel electrophoresis, random sequencing, and statistical ecology approaches. *Anaerobe*. 7: 119-134.
- Koenig, K.M., Newbold, C.J., McIntosh, F.M., and Rode, L.M. 2000. Effects of protozoa on bacterial nitrogen recycling in the rumen. *Journal of Animal Science*. 78: 2431- 2445.
- Koike, S., Yabuki, H., and Kobayashi, Y. 2007. Validation and application of real-time polymerase chain reaction assays for representative rumen bacteria. *Animal Science Journal*. 78: 135-141.
- Kong, Y., Teather, R., and Forster, R. 2010. Composition, spatial distribution, and diversity of the bacterial communities in the rumen of cows fed different forages. *FEMS Microbiol Ecol*. 74: 612-622.
- Koster, H. 1991. Oligonucleotide synthesis and multiplex DNA sequencing using chemiluminescent detection. *Nucleic Acids Symposium of Serology*. 24:318–321 (1991).
- Koster, H. 1996. A strategy for rapid and efficient DNA sequencing by mass spectrometry. *Nature Biotechnology*. 14:1123–1128.
- Krause, D.O., and Russell, J.B. 1996. How many ruminal bacteria are there? *Journal of Dairy Science*. 79: 1467-1475.
- Krause, K.M., Combs, D.K., and Beauchemin, K.A. 2002. Effects of forage particle size and grain fermentability in midlactation cows. II. Ruminal pH and chewing activity. *Journal of Dairy Science*. 85:1947-1957.
- Kromhout, D., Giltay, E.J., and Geleijnse, J.M. 2010. n-3 fatty acids and cardiovascular events after myocardial infarction. *The New England Journal of Medicine*. 363:2015–2026.
- Kühlsen, N., Pfeuffer, M., Soustre, Y., MacGibbon, A., Lindmark-Mansson, H., and Schrezenmeir, J. 2005. Trans fatty acids: Scientific progress and labelling. In: *Bulletin of the International Dairy Federation* (International Dairy Federation - Fédération Internationale de Laiterie, Brussels, Belgium). 393.

- Kühn, W., Fiebig, K., Hippe, H., Mah, R.A., Huser, B.A., and Gottschalk, G. 1983. Distribution of cytochromes in methanogenic bacteria. *FEMS Microbiology Letters*. 20: 407–410.
- Kumar, S., Puniya, A.K., Puniya, M., Dagar, S.S., Sirohi, S.K., Singh, K., and Griffith, G.W. 2009. Factors affecting rumen methanogens and methane mitigation strategies. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 25: 1557-1566.
- Kumar, P.S., Brooker, M.R., Dowd, S.E., and Camerlengo, T. 2011. Target region selection is a critical determinant of community fingerprints generated by 16S pyrosequencing. *PLoS one*, 6: e20956.
- Kunin, V., Engelbrekton, A., Ochman, H., and Hugenholtz, P. 2010. Wrinkles in the rare biosphere: pyrosequencing errors can lead to artificial inflation of diversity estimates. *Environmental Microbiology*. 12: 118-123.
- Landau, S., Perevolotsky, A., Bonfil, D., Barkai, D., and Silanikove, N. 2000. Utilization of low quality resources by small ruminants in Mediterranean agro-pastoral systems: the case of browse and aftermath cereal stubble. *Livestock Production Science*. 64: 39-49.
- Lara-Villoslada, F., Olivares, M., Jiménez, J., Boza, J., and Xaus, J. 2004. Goat milk is less immunogenic than cow milk in a murine model of atopy. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*. 39: 354–360.
- Larue, R., Yu, Z., Parisi, V.A., Egan, A.R., and Morrison, M. 2005. Novel microbial diversity adherent to plant biomass in the herbivore gastrointestinal tract, as revealed by ribosomal intergenic spacer analysis and rrs gene sequencing. *Environmental Microbiology*. 7: 530-543.
- Lascano, G.J., and Heinrichs, A.J. 2009. Rumen fermentation pattern of dairy heifers fed restricted amounts of low, medium, and high concentrate diets without and with yeast culture. *Livestock Science*. 124:48–57.
- Latham, M.J. 1980. Adhesion of rumen bacteria to plant cell walls. In: *Microbial Adhesion to Surfaces*. (Eds R. C. W. Berkeley, J. M. Lynch, J. Melliney, R. P. Rutter and B. Vincent). Chichester, Reino Unido: Ellis Harwood Ltd. 339-350.
- Lawson, R.E., Moss, A.R., and Givens, D.I. 2001. The role of dairy products in supplying conjugated linoleic acid to man's diet: a review. *Nutrition Research Review*. 14:153-172.
- Lefrileux, Y., Morand-Fehr, P., and Pommare, A. 2008. Capacity of high milk yielding goats for utilizing cultivated pasture. *Small Ruminant Research*. 77:113-126.
- Leger, C.L., Razanamehefa, L., and Margaritis, I. 2007. Health risks and benefits of trans fatty acids including conjugated fatty acids in food: Synopsis of the AFSSA report and recommendations. *European Journal of Lipid Science and Technology*. 109: 887-890.
- Leiber, F., Kreuzer, M., Nigg, D., Wettstein, H.R., and Scheeder, M.R.L. 2005. A study on the causes for the elevated n-3 fatty acids in cows' milk of alpine origin. *Lipids*. 40:191–202.
- Ley, R.E., Peterson, D.A., and Gordon, J.I. 2006. Ecological and evolutionary forces shaping microbial diversity in the human intestine. *Cell*. 837-848.

Capítulo 8

- Ley, R.E., Lozupone, C.A., Hamady, M., Knight, R., and Gordon, J.I. 2008. Worlds within worlds: evolution of the vertebrate gut microbiota. *Nature Reviews Microbiology*. 6: 776-788.
- Li, Y., and Watkins, B.A. 2006. CLA in human nutrition and health: human studies. In: Akoh CC (Ed.) *Handbook of functional lipids*. Taylor and Francis Group. Boca Raton, FL, USA. pp. 363-388.
- Lin, C., Raskin, L., and Stahl, D.A. 1997. Microbial community structure in gastrointestinal tracts of domestic animals: comparative analyses using rRNA-targeted oligonucleotide probes. *FEMS Microbiology Ecology*. 22: 281-294.
- Liu, X., Wang, Z., and Lee, F. 2005. Influence of concentrate level on dry matter intake, N balance, nutrient digestibility, ruminal outflow rate, and nutrient degradability in sheep. *Small Ruminant Research*. 58:55-62.
- Lock, A.L., and Bauman, D.E. 2004. Modifying milk fat composition of dairy cows to enhance fatty acids beneficial to human health. *Lipids*. 39:1197-1206.
- Lock, A.L., Destailats, F., Kraft, J., and German, J.B. 2008. Introduction to the Proceedings of the Symposium "Scientific update on dairy fats and cardiovascular diseases". *Journal of the American College of Nutrition*. 27:720S-722S.
- López, S. 2005. In vitro and in situ techniques for estimating digestibility. In: *Quantitative aspects of ruminant digestion and metabolism* (Eds J. Dijkstra, J. M. Forbes and J. France). Wallingford, Reino Unido: CABI Publishing.
- López-Aliaga, I., Alférez, M.J.M., Barrionuevo, M., Nestares, T., Sanz Sampelayo, M.R., and Campos, M.S. 2003. Study of nutritive utilization of protein and magnesium in rats with resection on the distal small intestine. Beneficial effect of goat milk. *Journal of Dairy Science*. 86: 2958–2966.
- Lorgeril, M., and Salen, P. 2004. Use and misuse of dietary fatty acids for the prevention and treatment of coronary heart disease. *Reproduction and Nutrition Development*. 44: 283.288.
- Luna, P., Bach, A., Juárez, M., and de la Fuente, M.A. 2008. Influence of diets rich in flax seed and sunflower oil on the fatty acid composition of ewes' milk fat especially on the level of conjugated linoleic acid, n-3 and n-6 fatty acids. *International Dairy Journal*. 18: 99-107.
- Macdonald, H.B. 2000. Conjugated linoleic acid and disease prevention: a review of current knowledge. *Journal of the American College of Nutrition*, 19:111Se118S.
- Machmüller, A., and Kreuzer, M. 1999. Methane suppression by coconut oil and associated effects on nutrient and energy balance in sheep. *Canadian Journal of Animal Science*. 79: 65–72.
- Machmüller, A., Ossowski, D.A., and Kreuzer, M. 2000. Comparative evaluation of the effects of coconut oil, oilseeds and crystalline fat on methane release, digestion and energy balance in lambs. *Animal Feed Science and Technology*. 85: 41–60.
- Machmüller, A., Soliva, C.R., and Kreuzer, M. 2003a. Methane suppressing effect of myristic acid in sheep as affected by dietary calcium and forage proportion. *British Journal of Nutrition*. 90: 529–540.

- Machmüller, A., Soliva, C.R., and Kreuzer, M. 2003b. Effect of coconut oil and defaunation treatment on methanogenesis in sheep. *Reproduction Nutrition Development*. 43: 41–55.
- Mackie, R.I. 1997. Gut environment and evolution of mutualistic fermentative digestion. In: *Gastrointestinal Microbiology v1: Gastrointestinal ecosystems and fermentations*, Vol. 1, 13-35 (Eds R. I. Mackie and B. A. White). Nueva York, EEUU: Chapman and Hall.
- Mackie, R.I., McSweeney, C.S., and Klieve, A.V. 2002. Microbial ecology of the ovine rumen. In: *Sheep nutrition*, 71-94 (Eds M. Freer and H. Dove). Oxon, NY, EEUU: CABI Publishing.
- MacLeod, G.K., Yu, Y., and Schaeffer, L.R. 1977. Feeding value of protected animal tallow for highyielding dairy cows. *Journal of Dairy Science*. 60:726.
- Madrid, J., Hernández, F., Pulgar, M.A., and Cid, J.M. 1997. Urea and citrus by-product supplementation of straw-based diets for goats: effect on barley straw digestibility. *Small Ruminant Research*. 24: 149-155.
- Madrid, J., Hernández, F., Pulgar, M.A., and Cid, J.M. 1998. Effects of citrus by-product supplementation on the intake and digestibility of urea + sodium hydroxide-treated barley straw in goats. *Small Ruminant Research*. 28: 241–248.
- Maeng, W.J., and Baldwin, R.L. 1976. Factors influencing rumen microbial growth rates and yields: effect of amino acid additions to a purified diet with nitrogen from urea. *Journal of Dairy Science*. 59:648-655.
- Mahgoub, O., Kadim, I.T., Forsberg, N.E., Al-Ajmi, D.S., Al-Saqry, N.M., Al-Abri, A.S., and Annamalai, K. 2005. Evaluation of Meskit (*Prosopis juliflora*) pods as a feed for goats. *Animal Feed Science and Technology*. 121:319-327.
- Mahgoub, O., Kadim, I.T., Al-Busaidi, M.H., Al-Saqri, N.M., and Annamalai, K. 2007. Effects of feeding ensiled date palm fronds and a by-product concentrate on performance and meat quality of Omani sheep. *Animal Feed Science and Technology*. 135: 210–221.
- Maia, M.R.G., Chaudhary, L.C., Figueres, L., and Wallace, R.J. 2007. Metabolism of polyunsaturated fatty acids and their toxicity to the microflora of the rumen. *Anton van Leeuwenhoek*. 91:303-314.
- Makkar, H., and Jayasuriya, M. 2000. Development and field evaluation of animal feed supplementation packages. *Proceedings of Final Review Meeting of an IAEA Technical Cooperation Regional AFRA Project*. Joint FAO/IAEA Division of Nuclear Techniques in Food and Agriculture, Cairo, Egypt. 25–29.
- Makkar, H.P.S. 2003. Effects and fate of tannins in ruminant animals, adaptation to tannins, and strategies to overcome detrimental effects of feeding tannin-rich feeds. *Small Ruminant Research*. 49: 241–256.
- Malau-Aduli, B.S., Eduvie, L.O., Lakpini, C.A.M., and Malau-Aduli, A.E.O. 2003. Variations in liveweight gains, milk yield and composition of Red Sokoto goats fed crop-residue-based supplements in the subhumid zone of Nigeria. *Livestock Production Science*. 83:63-71.
- Mardis, E.R. 2008a. Next-generation DNA sequencing methods. *Annual review of genomics and human genetics*. 9: 387-402.

Capítulo 8

- Mardis, E.R. 2008b. The impact of next-generation sequencing technology on genetics. *Trends in Genetics*. 24: 133-141.
- Margulies, M., Egholm, M., Altman, W.E., Attiya, S., Bader, J.S., Bemben, L.A., Berka, J. (2005). Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. *Nature*. 437:376-380.
- MARM. 2010. Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino. *Anuario de Estadística*. http://www.mapa.es/estadistica/pags/anuario/2010/Anuario_2010.pdf
- MARM. 2011. Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino. *Anuario de Estadística*. http://www.mapa.es/estadistica/pags/anuario/2011/Anuario_2011.pdf
- MARM. 2012. Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino. *Anuario de Estadística*. http://www.mapa.es/estadistica/pags/anuario/2012/Anuario_2012.pdf.
- Martin, C., Rouel, J., Jouany, J.P., Doreau, M., and Chilliard, Y. 2008. Methane output and diet digestibility in response to feeding dairy cows crude linseed, extruded linseed, or linseed oil. *Journal of Animal Science*. 86: 2642–2650.
- Martin, C., Morgavi, D.P., and Doreau, M. 2010. Methane mitigation in ruminants: from microbe to the farm scale. *Animal*. 4: 351–365.
- Martin, J.C., and Valeille, K. 2002. Conjugated linoleic acids: all the same or to everyone its own function. *Reproduction and Nutrition Development*. 42: 525-536.
- Martín-García, A.I. 2001. *Potencial de la hoja de olivo y del orujo de dos fases como alimentos para ovino y caprino. Valoración nutritiva mediante técnicas de simulación*. Tesis Doctoral. Universidad de Granada. España.
- Martín-Orúe, S.M., Balcells, J., Vicente, F., and Castrillo, C. 2000. Influence of dietary rumen-degradable protein supply on rumen characteristics and carbohydrate fermentation in beef cattle offered high-grain diets. *Animal Feed Science and Technology*. 88:59-78.
- Martínez-Marín, A. 2011. *Adición de aceites vegetales de diferente grado de insaturación a la ración de cabras lecheras*. Tesis Doctoral. Universidad de Córdoba. España.
- Martinez-Sibaja, A., Alvarado-Lassman, A., Astorga-Zaragoza, C.M., Adam-Medina, M., and Posada-Gómez, R. 2010. Interval observer for a continuous UASB reactor. Publicado en la Memoria Técnica del 12th IWA *World Congress of Anaerobic Digestion*.
- Masson, C. 1989. *La digestion chez les caprins: Adaptations à la valeur alimentaire de différents fourrages et comparación avec les ovins*. Tesis Doctoral. Universidad de Borgoña, Francia.
- McAllan, A.B., and Smith, R.H. 1973. Degradation of nucleic acid derivatives by rumen bacteria in vitro. *British Journal of Nutrition*. 29:467-474.
- McAllister, T.A., Bae, H.D., Jones, G.A., and Cheng, K.J. 1994. Microbial attachment and feed digestion in the rumen. *Journal of Animal Science*. 72: 3004-3018.
- McAllister, T.A., Cheng, K.J., Okine, E.K., and Mathison, G.W. 1996. Dietary, environmental and microbiological aspects of methane production in ruminants. *Canadian Journal of Animal Science*, 76:231-243.

- McCrabb, G.J., Berger, K.T., Magner, T., May, C., and Hunter, R.A. 1997. Inhibiting methane production in Brahman cattle by dietary supplementation with a novel compound and the effects on growth. *Australian Journal of Agricultural Research*. 48:323–329.
- McGinn, S.M., Beauchemin, K.A., Coates, T., and Colombatto, D. 2004. Methane emissions from beef cattle: effects of monensin, sunflower oil, enzymes, yeast, and fumaric acid. *Journal of Animal Science*. 82: 3346–3356.
- McMichael, A.J., Powles, J.W., Butler, C.D., and Uauy, R. 2007. Food, livestock production, energy, climate change, and health. *The Lancet*. 370: 1253–1263.
- Melamede, R.J. 1985. Automatable process for sequencing nucleotide. *US patent*. 4:863-849.
- Meldrum, D. 2000. Automation for genomics, part one: preparation for sequencing. *Genome Research*. 10: 1081–1092.
- Mena-Guerrero, Y., Castel-Genís, J.M., Caravaca-Rodríguez, F.P., Guzmán-Guerrero, J.L., and González-Redondo, P. 2005. Situación actual, evolución y diagnóstico de los sistemas semiextensivos de producción caprina en Andalucía centro-occidental. *Junta de Andalucía*. Sevilla, España. ISBN: 84- 8474-160-5.
- Mena-Guerrero, Y., Castel, J.M., Romero, F., García, M., and Micheo, J.M. 2005. Caracterización técnico-económica de los sistemas caprinos lecheros de raza Malagueña. In: *XXX Jornadas científicas y IX Internacionales de la Sociedad Española de Ovinotecnia y Caprinotecnia*, Granada, España. 175-177.
- Mena-Guerrero, Y., Nahed, J., Ruíz, F.A., Castel, J.M., and Ligeró, M. 2009. Proximity to the organic model of dairy goat systems in the Andalusian mountains (Spain). *Tropical and Subtropical Agroecosystem*. 11: 69–73.
- Mensink, R.P., Zock, P.L., Kester, A., and Katan, M.B. 2003. Effects of dietary fatty acids and carbohydrates on the ratio of serum total to HDL cholesterol ratio and on serum lipids and apolipoproteins: A meta-analysis of 60 controlled trials. *American Journal of Clinical Nutrition*. 7:1146-1155.
- Merry, R.J., and McAllan, A.B. 1983. A comparison of the chemical composition of mixed bacteria harvested from the liquid and solid fractions of rumen digesta. *British Journal of Nutrition*. 50: 701-709.
- 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 temperature forages: A review. *Animal Feed Science and Technology*. 106:3–19.
- Minato, H., Endo, A., Higuchi, M., Comoto, Y., and Vemura, T. 1966. Ecological treatise on the rumen fermentation. I. The fractionation of bacteria attached to the rumen digesta solids. *Journal of General Applied Microbiology*. 12: 39-52.
- Minato, H., Ishibashi, S., and Hamaoka, T. 1988. Cellular fatty acid and sugar composition of representative strains of rumen bacteria. *Journal of General and Applied Microbiology*. 34: 303-319.
- Minato, H., Mitsumori, M., and Cheng, K.J. 1993. Attachment of microorganisms to solid substrate in the rumen. In: *Genetics, Biochemistry and Ecology of Lignocellulose Degradation* 139–145 (Eds K. Shimada, K. Ohmiya, Y. Kobayashi, S. Hoshino, K. Sakka and S. Karita).

Capítulo 8

- Mir, Z., Goonewardene, L.A., Okine, E., Jaegar, S., and Scheer, H.D. 1999. Effect of feeding canola oil on constituents, conjugated linoleic acid (CLA) and long chain fatty acids in goats milk. *Small Ruminant Research*. 33: 137-143.
- Mirzaei-Aghsaghali, A., and Maheri-Sis, N. 2008. Nutritive value of some agro-industrial by-product for ruminants: a review. *World Journal of Zoology*. 3: 40-46.
- Modaresi, J., Fathi Nasri, M.H., Rashidi, L., Dayani, O., and Kebreab, E. 2011. Short communication: Effects of supplementation with pomegranate seed pulp on concentrations of conjugated linoleic acid and punicic acid in goat milk. *Journal of Dairy Science*. 94: 4075–4080.
- Moe, P.W., and Tyrrell, H.F. 1979. Methane production in dairy cows. *Journal of Dairy Science*. 62:1583
- Mohammed, N., Ajisaka, N., Lila, Z., Mikuni, K., Hara, K., Kanda, S., and Itabashi, H. 2004a. Effect of Japanese horseradish oil on methane production and ruminal fermentation in vitro and in steers. *Journal of Animal Science*. 82: 1839–1846.
- Mohammed, N., Lila, Z., Ajisaka, N., Hara, K., Mikuni, K., Hara, K., Kanda, S., and Itabashi, H. 2004b. Inhibition of ruminal microbial methane production by b-cyclodextrin iodopropane, malate and their combination in vitro. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*. 88: 188–195.
- Moir, R.J. 1965. The comparative physiology of ruminant-like animals. In: *Physiology of Digestion in the Ruminant*, 1-14 (Ed R. W. Dougherty). Londres, Reino Unido. Butterworths.
- Molano, G., Knight, T.W., and Clark, H. 2008. Fumaric acid supplements have no effect on methane emissions per unit of feed intake in wether lambs. *Australian Journal of Experimental Agriculture*. 48: 165–168.
- Molina-Alcaide, E., Weisbjerg, M.R. and Hvelplund, T. 1996. Degradation characteristics of shrubs and the effect of supplementation with urea or protein on microbial production using a continuous-culture system. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*. 75: 121–132.
- Molina-Alcaide, E., García, M.A., and Aguilera, J.F. 1997. The voluntary intake and rumen digestion by grazing goats and sheep of a low-quality pasture from a semi-arid land. *Livestock Production Science*. 52: 39-47.
- Molina-Alcaide, E., García Martín, A., and Aguilera, J. 2000. A comparative study of nutrient digestibility, kinetics of degradation and passage and rumen fermentation pattern in goats and sheep offered good quality diets. *Livestock Production Science*. 64: 215–223.
- Molina-Alcaide, E., Moumen, A., and Martín-García, A.I. 2008. By-products from viticulture and wine industry: potential as sources of nutrients for ruminants. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 88: 597-537.
- Molina-Alcaide, E., and Yáñez-Ruiz, D.R. 2008. Potential use of olive by-products in ruminant feeding: A review. *Animal Feed Science and Technology*. 147:247-264.
- Molina-Alcaide, E., Pascual, M.R., Cantalapiedra-Hijar, G., Morales-García, E.Y., and Martín- García, A.I. 2009. Effects of concentrate replacement by feed blocks on

- ruminal fermentation and microbial growth in goats and single-flow continuous-culture fermenters. *Journal of Animal Science*. 87: 1321-1333.
- Molina-Alcaide, E., Morales-García, E.Y., Martín-García, A.I., Ben Salem, H., Nefzaoui, A., and Sanz-Sampelayo, M.R. 2010a. Effects of partial replacement of concentrate with feed blocks on nutrient utilization, microbial N flow, and milk yield and composition in goats. *Journal of Dairy Science*. 93: 2076-2087.
- Molina-Alcaide, E., Moumen, A., Martín-García, I., and Carro, M.D. 2010b. Ruminal fermentation, microbial growth and amino acid flow in single-flow continuous culture fermenters fed a diet containing olive leaves. *Journal of animal physiology and animal nutrition*. 94: 227-236.
- Moorby, J.M., Dewhurst, R.J., Evans, R.T., and Danelon, J.L. 2006. Effects of dairy cow diet forage proportion on duodenal nutrient supply and urinary purine derivative excretion. *Journal of Dairy Science*. 89:3552-3562.
- Moore, G. 1965. Cramming more components onto integrated circuits. *Electronics*. 38.
- Morales, A.R., Galina, M.A., Jimenez, S., and Haenlein, G.F.W. 2000. Improvement of biosustainability of a goat feeding system with key supplementation. *Small Ruminant Research*. 35:97-105.
- Morand-Fehr, P.M., and Sauvant, D. 1980. Composition and yield of goat milk as affected by nutritional manipulation. *Journal of Dairy Science*. 63: 1671-1680.
- Morand-Fehr, P., Boutonnet, J.P., Devendra, C., Dubeuf, J.P., Haenlein, G.F.W., Holst, P., Mowlem, L., and Capote, J. 2004. Strategy for goat farming in the 21st century. *Small Ruminant Research*. 51: 175-183.
- Moreno, C.E. 2001. *Métodos para Medir la Biodiversidad*. CYTED, ORCYT/UNESCO y SEA, Zaragoza.
- Morgavi, D.P., Jouany, J.P., Martin, C., and Ranilla, M.J. 2006. Archaeal community structure diversity in the rumen of faunated and defaunated sheep. In: *Proceedings of the 2nd International Conference on Greenhouse Gases and Animal Agriculture*. (Zurich, Suiza. International Congress Series: Greenhouse Gases and Animal Agriculture). 1293: 127-130.
- Morgavi, D.P., Jouany, J.P., and Martin, C. 2008. Changes in methane emission and rumen fermentation parameters induced by defaunation in sheep. *Australian Journal of Experimental Agriculture*. 48: 69-72.
- Morgavi, D.P., Forano, E., Martin, C., and Newbold, C.J. 2010. Microbial ecosystem and methanogenesis in ruminants. *Animal*. 4: 1024-1036.
- Moss, A.R., and Givens, D.I. 2002. The effect of supplementing grass silage with soya bean meal on digestibility, in sacco degradability, rumen fermentation and methane production in sheep. *Animal Feed Science and Technology*. 97:127-144.
- Moss, A.R., Jean-pierre, J., and Newbold, C.J. 2000. Review article Methane production by ruminants: its contribution to global warming. *Annales de Zootechnie*. 49: 231-253.
- Mota, M., Balcells, J., Ozdemir-Babar, N.H., Bölüktepe, S., and Belenguer, A. 2008. Modelling purine derivative excretion in dairy goats: endogenous excretion and the relationship between duodenal input and urinary output. *Animal*. 2:44-51.

Capítulo 8

- Motard-Bélanger, A., Charest, A., Grenier, G., Paquin, P., Chouinard, Y., Lemieux, S., Couture, P., and Lamarche, B. 2008. Study of the effect of trans fatty acids from ruminants on blood lipids and other risk factors for cardiovascular disease. *American Journal of Clinical Nutrition*. 87:593-599.
- Mould, F.L., and Ørskov, E.R. 1983. Manipulation of rumen fluid pH and its influence on cellulolysis in sacco, dry matter degradation and the rumen microflora of sheep offered either hay or concentrate. *Animal Feed Science and Technology*. 10:1-14.
- Mould, F.L., Ørskov, E.R., and Mann, S.O. 1983. Associative effects of mixed feeds. I. Effects of type and level of supplementation and the influence of the rumen fluid pH on cellulolysis in vivo and dry matter digestion of various roughages. *Animal Feed Science and Technology*. 10:15-30.
- Moumen, A. 2003. *Valoración nutritiva, mediante técnicas de simulación, de dietas para pequeños rumiantes basadas en orujo de dos fases u hoja de olivo. Potencial predictivo*. Tesis Doctoral. Universidad de Granada. España.
- Mountfort, D.O., Asher, R.A., and Bauchop, T. 1982. Fermentation of cellulose to methane and carbon dioxide by a rumen anaerobic fungus in a triculture with *Methanobrevibacter sp.* strain RA1 and *Methanosarcina barkeri*. *Applied and Environmental Microbiology*. 44:128–134.
- Mozaffarian, D., Katan, M.B., Ascherio, A., Stampfer, M.J., and Willett, W.C. 2006. Medical progress - Trans fatty acids and cardiovascular disease. *The New England Journal of Medicine*. 354:1601-1613.
- Murtagh, F. 1984. Structure of hierarchic clusterings: implications for information retrieval and for multivariate data analysis. *Information Processing and Management*. 20: 611-617.
- Mussatto, S.I., Dragone, G., and Roberto, I.C. 2006. Brewersö spent grain: Generation, characteristics and potential applications. *Journal of Cereal Science*. 43: 1-14.
- Muyzer, G., de Waal, E.C., and Uitterlinden, A.G. 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*. 59:695–700.
- National Research Council. NRC. 2001. *Nutrient Requirements of Dairy Cattle*. 7.rev. ed. Washington, D.C.
- National Research Council-NRC. 2003. *Air emissions from animal feeding operations*. National Academy of Science, Washington, DC. 263.
- Navarro, M., Badimon, L., Rodríguez, C., Arnal, C., Noone, E., Roche, H., Osada, J., and Martínez-González, J. 2010. Trans-10, cis-12-CLA dysregulate lipid and glucose metabolism and induce hepatic NR4A receptors. *Frontiers in Bioscience*. 2:87-97.
- Neefs, J.M., Van De Peer, Y., Hendriks, L., and De Wachter, R. 1990. Compilation of small ribosomal subunit RNA sequences. *Nucleic Acids Resarch*. 18: 2237-2317.

- Newbold, C.J., Lassalas, B., and Jouany, J.P. 1995. The importance of methanogens associated with ciliate protozoa in ruminal methane production in vitro. *Letters in Applied Microbiology*. 21: 230–234.
- Newbold, C., McIntosh, F., Williams, P., Losa, R., and Wallace, R. 2004. Effects of a specific blend of essential oil compounds on rumen fermentation. *Animal Feed Science and Technology*. 114: 105–112.
- Nollet, L., Mbanzamihigo, L., Demeyer, D., and Verstraete, W. 1998. Effect of the addition of *Peptostreptococcus productus* ATCC 35244 on reductive acetogenesis in the ruminal ecosystem after inhibition of methanogenesis by cell-free supernatant of *Lactobacillus plantarum* 80. *Animal Feed Science and Technology*. 71: 49–66.
- Nyren, P., Pettersson, B., and Uhlen, M. 1993. Solid phase DNA minisequencing by an enzymatic luminometric inorganic pyrophosphate detection assay. *Analytical Biochemistry*. 208: 171–175.
- Obispo, N.E., and Dehority, B.A. 1999. Feasibility of using total purines as a marker for ruminal bacteria. *Journal of Animal Science*. 77:3084-3095.
- Odongo, N.E., Or-Rashid, M.M., Kebreab, E., France, J., and McBride, B.W. 2007. Effect of supplementing myristic acid in dairy cow rations on ruminal methanogenesis and fatty acid profile in milk. *Journal of Dairy Science*. 90: 1851–1858.
- Ogimoto, K., and Imain, S. 1981. Rumen bacteria. In: *Atlas of Rumen Microbiology*. (Japan: Japan Society Press). 35: 22-27.
- O'Hara, R.B. 2005. Species richness estimators: how many species can dance on the head of a pin? *Journal of Animal Ecology*. 74:375–386.
- Olfaz, M., Ocak, N., Erener, G., Cam, M.A., and Garipoglu, A.V. 2005. Growth, carcass and meat characteristics of Karayaka growing rams fed sugar beet pulp, partially substituting for grass hay as forage. *Meat Science*. 70:7-14.
- Oliveira, S.G., Berchielli, T.T., Pedreira, M.D.S., Primavesi, O., Frighetto, R., and Lima, M.A. 2007. Effect of tannin levels in sorghum silage and concentrate supplementation on apparent digestibility and methane emission in beef cattle. *Animal Feed Science and Technology*. 135: 236–248.
- Olsen, G.J., Lane, D.J., Giovannoni, S.J., Pace, N.R., and Stahl, D.A. 1986. Microbial ecology and evolution: a ribosomal RNA approach. *Annual Reviews in Microbiology*. 40:337-365.
- Orellana-Boero, P., Balcells, J., Martín-Orúe, S.M., Liang, J.B., and Guada, J.A. 2001. Excretion of purine derivatives in cows: Endogenous contribution and recovery of exogenous purine bases. *Livestock Production Science*. 68:243-250.
- Orpin, C.G., and Munn, E.A. 1974. The occurrence of bacteriophages in the rumen and their influence on rumen bacterial populations. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 30: 1018-1020.
- Orpin, C.G. and Bountiff, L. 1978. Zoospore chemotaxis in the rumen phycomycete *Neocallimastix frontalis*. *Journal of General Microbiology*. 104: 113-122.
- Orpin, C.G. 1981. Isolation of cellulolytic phycomycete fungi from the caecum of the horse. *Journal of General Microbiology*. 123: 187-196.

Capítulo 8

- Orpin, C.G., and Joblin, K.N. 1997. The rumen anaerobic fungi. In: Hobson, P.N., Stewart, C.S. (Eds.) *The rumen microbial ecosystem*. 2.ed. London: Blackie. 140-195.
- Ørskov, E.R., Flatt, W.P., and Moe, P.W. 1968. Fermentation balance approach to estimate extent of fermentation and efficiency of volatile fatty acid formation in ruminants. *Journal of Dairy Science*. 51:1429-1435.
- Ørskov, E.R., and Fraser, C. 1975. The effects of processing of barley-based supplements on rumen pH, rate of digestion and voluntary intake of dried grass in sheep. *British Journal of Nutrition*. 34:493-500.
- Ørskov, E.R. 1982. *Protein Nutrition in Ruminants*. Academic Press. Nueva York. 160.
- Ørskov, E.R., Ryle, M. 1990. *Energy Nutrition in Ruminants*. Elsevier Applied Science, Londres, Reino Unido.133-144.
- Ørskov, E.R. 1999. Supplement strategies for ruminants and management of feeding to maximize utilization of roughages. *Preventive Veterinary Medicine*. 38:179-185.
- Ouwerkerk, D., Turner, A.F., and Klieve, A.V. 2008. Diversity of methanogens in ruminants in Queensland. *Australian Journal of Experimental Agriculture*. 48: 722–725.
- Owens, F.N., and Bergen, W.G. 1983. Nitrogen metabolism of ruminant animals: historical. *Journal of Animal Science*. 57:498-518.
- Owens, D., McGee, M., Boland, T., and O’Kiely, P. 2008. Intake, rumen fermentation and nutrient flow to the omasum in beef cattle fed grass silage fortified with sucrose and/or supplemented with concentrate. *Animal Feed Science and Technology*. 144:23-43.
- Pace, N.R. 1997 A molecular view of microbial diversity and the biosphere. *Science*. 276: 734–740.
- Paillard, D., McKain, N., Chaudhary, L.C., Walker, N.D., Pizette, F., Koppova, I., McEwan, N.R., Kopečný, J., Vercoe, P.E., Louis, P., and Wallace, R.J. 2007. Relation between phylogenetic position, lipid metabolism and butyrate production by different *Butyrivibrio*-like bacteria from the rumen. *Antonie van Leeuwenhoek*. 91:417-422.
- Pariza, M.W., Park, Y., and Cook, M.E. 2001. The biologically active isomers of conjugated linoleic acid. *Progress in Lipid Research*. 40:283-298.
- Park, Y.W. 1994. Hypo-allergenic and therapeutic significance of goat milk. *Small Ruminant Research*. 14: 151–161.
- Park, Y.W., Juárez, M., Ramos, M., and Haenlein, G.F.W. 2007. Physico-chemical characteristics of goat and sheep milk. *Small Ruminant Research*. 68: 88-113.
- Pariza, M.W. 2004. Perspective on the safety and effectiveness of conjugated linoleic acid. *American Journal of Clinical Nutrition*. 79:1132–1136.
- Parodi, P.W. 1997. Cow’s milk fat components as potential anticarcinogenic agents. *Journal of Nutrition*. 127: 1055-1060.
- Parodi, P.W. 1999. Conjugated linoleic acid and other anticarcinogenic agents of bovine milk fat. *Journal of Dairy Science*. 82: 1339-1349.

- Parodi, P.W. 2009. Has the association between saturated fatty acids, serum cholesterol and coronary heart disease been over emphasized? *International Dairy Journal*. 19:345-361.
- Patra, A.K., and Saxena, J. 2009. A review of the effect and mode of action of saponins on microbial population and fermentation in the rumen and ruminant production. *Nutrition Research Reviews*. 22: 204–219.
- Patra, A.K., and Saxena, J. 2010. A new perspective on the use of plant secondary metabolites to inhibit methanogenesis in the rumen. *Phytochemistry*. 71: 1198-1222.
- Paynter, M.J.B., Ewert, D.L., and Chalupa, W. 1969. Some morphological types of bacteriophages in bovine rumen contents. *Applied Microbiology*. 18: 942-943.
- Pérez, J.F., Balcells, J., Guada, J.A., and Castrillo, C. 1996. Determination of rumen microbial-nitrogen production in sheep: a comparison of urinary purine excretion with methods using ¹⁵N and purine bases as markers of microbial-nitrogen entering the duodenum. *British Journal of Nutrition*. 75:699-710.
- Pérez, J.F., Balcells, J., Guada, J.A., and Castrillo, C. 1997. Rumen microbial production estimated either from urinary purine derivative excretion or from direct measurements of sup (¹⁵ N and purine bases as microbial markers: effect of protein source and rumen bacteria isolates. *Animal Science*. 65:225- 236.
- Pérez, J.F., Balcells, J., Cebrián, J.A., and Martín-Orúe, S.M. 1998. Excretion of endogenous and exogenous purine derivatives in sheep: effect of increased concentrate intake. *British Journal of Nutrition*. 79:237-240.
- Pfaffl, M.W. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT–PCR. *Nucleic acids research*. 29: 2002-2007.
- Pielou, E.C. 1966. The measurement of diversity in different types of biological collections. *Journal of Theoretical Biology*. 13:131–144.
- Pirmohammadi, R., Rouzbehan, Y., Rezayazdi, K., and Zahedifar, M. 2006. Chemical composition, digestibility and in situ degradability of dried and ensiled apple pomace and maize silage. *Small Ruminant Research*. 66:150-155.
- Pitt, R.E., Van Kessel, J.S., Fox, D.G., Pell, A.N., Barry, M.C., and Van Soest, P.J. 1996. Prediction of ruminal volatile fatty acids and pH within the net carbohydrate and protein system. *Journal of Animal Science*. 74:226-244.
- Possemiers, S., Verthé, K., Uyttendaele, S., and Verstraete, W. 2004. PCR-DGGE-based quantification of stability of the microbial community in a simulator of the human intestinal microbial ecosystem. *FEMS Microbiology Ecology*. 49: 495-507.
- Powell, J.M., Broderick, G.A., Grabber, J.H., and Hymes-Fecht, U.C. 2009. Technical note: Effects of forage protein-binding polyphenols on chemistry of dairy excreta. *Journal of Dairy Science*. 92:1765–1769.
- Pralomkarn, W., Kochapakdee, S., Saithanoo, S., and Norton, B.W. 1995. Energy and protein utilisation for maintenance and growth of Thai native and Anglo-Nubian x Thai native male weaner goats. *Small Ruminant Research*. 16:13-20.

Capítulo 8

- Prasitkusol, P., Ørskov, E.R., Chen, X.B., Hovell, F.D., Deb., and Kyle, D.J. 2002. Variation between sheep in renal excretion of ¹⁴C allantoin. *British Journal of Nutrition*. 87: 561-568.
- Prieto, C., Aguilera, J.F., Lara, L., and Fonollá, J. 1990. Protein and energy requirements for maintenance of indigenous Granadina goats. *British Journal of Nutrition*. 63:155-163.
- Puchala, R., Min, B.R., Goetsch, A.L., and Sahlu, T. 2005. The effect of a condensed tannin-containing forage on methane emission by goats. *Journal of Animal Science*. 83: 182–186.
- Pulina, G., Nudda, A., Battacone, G., and Cannas, A. 2006. Effects of nutrition on the contents of fat, protein, somatic cells, aromatic compounds, and undesirable substances in sheep milk. *Animal Feed Science and Technology*. 131:255-291.
- Ramette, A. 2007. Multivariate analyses in microbial ecology. *FEMS Microbiology Ecology*. 62: 142-160.
- Ramos, S., Ranilla, M.J., Martínez, M.E., Saro, C., Tejido, M.L., and Carro, M.D. 2009. Efecto de la relación forraje: concentrado y del tipo de forraje de la dieta sobre las comunidades bacterianas del rumen de ovejas. In: *XIII Jornadas sobre Producción Animal*. (Zaragoza, España: Asociación Interprofesional para el Desarrollo Agrario). 1: 760-762.
- Ramšak, A., Peterka, M., Tajima, K., Martin, J.C., Wood, J., Johnston, M.E.A., Aminov, R.I., Flint, H.J., and Avguštin, G. 2000. Unravelling the genetic diversity of ruminal bacteria belonging to the CFB phylum. *FEMS Microbiology Ecology*. 33: 69-79.
- Ranilla, M.J., Tejido, M.L., and Carro, M.D. 2001. Comparación de diversos métodos de desligamiento de bacterias ruminales asociadas a la fase sólida de la digesta en un sistema in vitro (Rusitec). *ITEA*. 22:382-384.
- Rapetti, L., Crovetto, G.M., Galassi, G., Sandrucci, A., Succi, G., Tamburini, A., and Battelli, G. 2002. Effect of maize, rumen-protected fat and whey permeate on energy utilisation and milk fat composition in lactating goats. *Italian Journal of Animal Science*. 1: 43-53.
- Rappe, M.S., and Giovannoni, S.J. 2003. The uncultured microbial majority. *Annual Review of Microbiology*. 57:369-394.
- Raskin, L., Zheng, D., Griffin, M.E., Stroot, P.G., and Misra, P. 1995. Characterization of microbial communities in anaerobic bioreactors using molecular probes. *Antonie van Leeuwenhoek*. 68: 297-308.
- Raskin, L., Capman, W.C., Sharp, R., and Stahl, D.A. 1997. Molecular ecology of gastrointestinal ecosystems. In: *Gastrointestinal Microbiology and Host Interactions*. (R.I. Mackie, B.A. White, B.A., R.E. Isaacson eds). Chapman and Hall. Nueva York. 2:243-298.
- Raynal-Ljutovac, K., Lagriffoul, G., Paccard, P., Guillet, I., and Chilliard, Y. 2008. Composition of goat and sheep milk products: An update. *Small Ruminant Research*. 79:57-72.
- Rees, G.N., Baldwin, D.S., Watson, G.O., Perryman, S., and Nielsen, D.L. 2004. Ordination and significance testing of microbial community composition derived

- from terminal restriction fragment length polymorphisms: application of multivariate statistics. *Antonie van Leeuwenhoek*. 86: 339-347.
- Regensbogenova, M., Pristas, P., Javorsky, P., Moon-van der Staay, S.Y., van der Staay, G.W.M., Hackstein, J.H.P., Newbold, C.J., and McEwan, N.R. 2004. Assessment of ciliates in the sheep rumen by DGGE. *Letters in Applied Microbiology*. 39: 144-147.
- Reynal, S.M., Broderick, G.A., Ahvenjarvi, S., and Huhtanen, P. 2003. Effect of feeding protein supplements of differing degradability on omasal flow of microbial and undegraded protein. *Journal of Dairy Science*. 86:1292-1305.
- Richards, D.E., Brown W.F., Rueggsegger, G., and Bates, D.B. 1994. Replacement value of tree legumes for concentrates in forage based diets. II. Replacement value of *Leucaena leucocephala* and *Gliricidia sepium* for lactating goats. *Animal Feed Science and Technology*. 46:53–65.
- Risérus, U., Vessby, B., Arnlöv, J., and Basu, S. 2004. Effects of cis9, trans11 conjugated linoleic acid supplementation on insulin sensitivity, lipid peroxidation, and proinflammatory markers in obese men. *American Journal of Clinical Nutrition*. 80: 279-283.
- Roger, V., Fonty, G., Komisarczuk-Bony, S., and Gouet, P. 1990. Effects of physicochemical factors on the adhesion to cellulose avicel of the ruminal bacteria *Ruminococcus flavefaciens* and *Fibrobacter succinogenes* subsp. *Succinogenes*. *Applied and Environmental Microbiology*. 56: 3081-3087.
- Romano, R., Masucci, F., Giordano, A., Musso, S.S., Naviglio, D., and Santini, A. 2010. Effect of tomato by-products in the diet of Comisana sheep on composition and conjugated linoleic acid content of milk fat. *International Dairy Journal*. 20: 858-862.
- Rothberg, J.M., and Leamon, J.H. 2008. The development and impact of 454 sequencing. *Nature Biotechnology*. 26: 1117-1124.
- Rouviere, P.E., and Wolfe, R.S. 1988. Novel biochemistry of methanogenesis. *Journal of Biological Chemistry*. 263: 7913–7916.
- Roy, A., Ferlay, A., Shingfield, K.J., and Chilliard, Y. 2006). Examination of the persistency of milk fatty acid composition responses to plant oils in cows given different basal diets, with particular emphasis on trans-C18:1 fatty acids and isomers of conjugated linoleic acid. *Animal Science*. 82:479-492.
- Roy, A., Chardigny, J.M., Bauchart, D., Ferlay, A., Lorenz, S., Durand, D., Gruffat, D., Faulconnier, Y., Sébédio, J.L., and Chilliard, Y. 2007. Butters rich either in trans-10-C18:1 or in trans-11-C18:1 plus cis-9, trans-11 CLA differentially affect plasma lipids and aortic fatty streak in experimental atherosclerosis in rabbits. *Animal*. 1:467-476.
- Russell, J.B., and Strobel, H.J. 1989. Effect of ionophores on ruminal fermentation. *Applied and Environmental Microbiology*. 55: 1–6.
- Russell, J.B., and Wallace, R.J. 1997. Energy-yielding and energy-consuming reactions. In: *The rumen microbial ecosystem*. (P. N. Hobson, C. S. Stewart ed), 2nd ed. Blackie, Londres, Reino Unido. pp. 246-282.

Capítulo 8

- 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.
- Sailas, B., and Spener, F. 2009. Conjugated linoleic acids as functional food: an insight into their health benefits. *Nutrition and Metabolism*. 6:1-13.
- Salem, N., Litman, B., Kim, H., and Gawrisch, K. 2001. Mechanisms of action of docosahexaenoic acid in the nervous system. *Lipids*. 36:945-959.
- Sánchez-Rodríguez, M., López-Baldán, D., Santos-Alcudia, R., and Martín-Martín, C.C. 2002. Situación de la producción de leche de cabra en España. *Mundo Ganadero*. 146: 37-43.
- Sánchez, M. 2008. Las razas caprinas andaluzas de fomento: Malagueña, Murciano-Granadina y Florida (The promotion andalusian goat breeds: Malagueña, Murciano-Granadina and Florida). In: *Patrimonio Ganadero Andaluz* (Andalusian Heritage Livestock). *Consejería de Agricultura y Pesca, Junta de Andalucía*, Sevilla. 169–194.
- Sanger, F. 1975. The Croonian Lecture. Nucleotide sequences in DNA. *Proceedings of the Royal Society of London. B Biol. Sci.* 191: 317–333.
- Sanger, F., and Coulson, A.R. 1975. A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *Journal of Molecular Biology*. 94: 441–448.
- Santini, F.J., Lu, C.D., Potchoiba, M.J., Fernandez, J.M., and Coleman, S.W. 1992. Dietary fiber and milk yield, mastication, digestion, and rate of passage in goats fed alfalfa hay. *Journal of Dairy Science*. 75:209-219.
- Santoso, B., Mwenya, B., Sar, C., and Takahashi, J. 2006. Ruminal fermentation and nitrogen metabolism in sheep fed a silage-based diet supplemented with *Yucca schidigera* or *Y. schidigera* and nisin. *Animal Feed Science and Technology*. 129:187-195.
- Sanz-Ceballos, L. 2007. *Caracterización de la leche de cabra frente a la de vaca. Estudio de su valor nutritivo e inmunológico*. Tesis Doctoral. Facultad de Farmacia, Universidad de Granada.
- Sanz-Ceballos, L., Sanz Sampelayo, M.R., Gil-Extremera, F., and Rodríguez-Osorio, M. 2009. Evaluation of the allergenicity of goat milk, cow milk, and their lactosera in a guinea pig model. *Journal of Dairy Science*. 92:837–846.
- Sanz-Sampelayo, M.R., Pérez, M.L., Gil-Extremera, F., Boza, J.J., and Boza, J. 1999. Use of different dietary protein sources for lactating goats: milk production and composition as functions of protein degradability and amino acid composition. *Journal of Dairy Science*. 82: 555-565.
- Sanz-Sampelayo, M.R., Martín-Alonso, J.J., Morón, D., Pérez, L., and Boza, J. 2000. Production of healthier goat milk. Use of a concentrate supplemented with a “protected” fat rich in PUFA. *Journal of Physiology and Biochemistry*. 56:231–236.
- Sanz-Sampelayo, M.R., Pérez, L., Martín-Alonso, J.J., Gil-Extremera, F., and Boza, J. 2002. Effects of concentrates with different contents of protected fat rich in PUFAs on the performance of lactating Granadina goats 1. Feed intake, nutrient

- digestibility. N and energy utilisation for milk production. *Small Ruminant Research*. 43: 133-139.
- Sanz-Sampelayo, M.R., Chilliard, Y., Schmidely, P., and Boza, J. 2007. Influence of type of diet on the fat constituents of goat and sheep milk. *Small Ruminant Research*. 68:42-63.
- Sarich, V.M., and Wilson, A.C. 1967. Immunological time scale for hominid evolution. *Science*. 158: 1200-1203.
- Satter, L.D., and Slyter, L.L. 1974. Effect of ammonia concentration on rumen microbial protein production in vitro. *British Journal of Nutrition*. 32:199-208.
- Sauer, F.D., Fellner, V., and Kinsman, R. 1998. Methane output and lactation response in Holstein cattle with monensin or unsaturated fat added to the diet. *Journal of Animal Science*. 76: 906–914.
- Sauvant, D., Meschy, F., and Mertens, D. 1999. Les composantes de l'acidose ruminale et les effets acidogènes des rations. *INRA Productions Animales*. 11: 49-60.
- Sauvant, D., and Giger-Reverdin, S. 2007. Empirical modelling meta-analysis of digestive interactions and CH₄ production in ruminants. In: *Energy and Protein Metabolism and Nutrition*. (Ortigue-Marty, I., Miraux, N., and Brand-Williams, W. Eds. Wageningen Academic, Wageningen, The Netherlands). pp. 561–563.
- Schelling, G.T., and Bryers, F.M. 1984. Cytosine as a marker for microbial nitrogen leaving the rumen. *Canadian Journal of Animal Science*. 64: 62-71.
- Schloss, P.D., and Handelsman, J. 2005. Introducing DOTUR, a computer program for defining operational taxonomic units and estimating species richness. *Applied and Environmental Microbiology*. 71:1501–1506.
- Schloss, P.D., and Handelsman, J. 2006. Toward a census of bacteria in soil. *PLoS Computational Biology*. 2:786–793.
- Schloss, P.D. 2008. Evaluating different approaches that test whether microbial communities have the same structure. *ISME Journal*. 2:265–275.
- Schniffen C.J., and Robinson, P.H. 1987. Microbial growth and flow as influenced by dietary manipulation. *Journal of Dairy Science*. 70:425-441.
- Schütte, U.M.E., Abdo, Z., Bent, S.J., Shyu, C., Williams, C.J., Pierson, J.D., and Forney, L.J. 2008. Advances in the use of terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) analysis of 16S rRNA genes to characterize microbial communities. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 80: 365-380.
- Shannon, C.E. 1997. The mathematical theory of communication. 1963. *MD Comput*. 14: 306–317.
- Sharp, R., Ziemer, C.J., Stern, M.D., and Stahl, D.A. 1998. Taxon-specific associations between protozoal and methanogen populations in the rumen and a model rumen system. *FEMS Microbiology Ecology*. 26: 71-78.
- Shi, P.J., Meng, K., Zhou, Z.G., Wang, Y.R., Diao, Q.Y., and Yao, B. 2008. The host species affects the microbial community in the goat rumen. *Letters in Applied Microbiology*. 46: 132-135.
- Shibata, M., and Terada, F. 2010. Factors affecting methane production and mitigation in ruminants. *Animal Science Journal*. 81: 2–10.

Capítulo 8

- Shin, E.C., Cho, K.M., Lim, W.J., Hong, S.Y., An, C.L., Kim, E.J., Kim, Y.K., Choi, B.R., An, J.M., Kang, J.M., Kim, H., and Yun, H.D. 2004. Phylogenetic analysis of protozoa in the rumen contents of cow based on the 18S rDNA sequences. *Journal of Applied Microbiology*. 97: 378-383.
- Shingfield, K.J., Chilliard, Y., Toivonen, V., Kairenius, P., and Givens, D.I. 2008. Trans fatty acids and bioactive lipids in ruminant milk. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 606:3-65.
- Sibanda, S., Topps, J.H., Storm, E., and Ørskov, E.R. 1982. The excretion of allantoin by ruminants in relation to protein entering the abomasum. *Proceedings of the Nutrition Society*. 41: 75.
- Sieber, R., Collomb, M., Aeschlimann, A., Jelen, P., and Eyer, H. 2004. Impact of microbial cultures on conjugated linoleic acid in dairy products: a review. *International Dairy Journal*. 14:1-15.
- Silanikove, N. 2000. Goat production under harsh environmental conditions: The physiological basis and the challenge. *The Opportunities and Challenges for Enhancing Goat Production in East Africa*. Langston University, Langston, OK, 6–28.
- Simopoulos, A.P. 2008. The importance of the omega-6/omega-3 fatty acid ratio in cardiovascular disease and other chronic diseases. *Experimental Biology and Medicine*. 233:674-688.
- Simpson, J.M., Kocherginskaya, S.A., Aminov, R.I., Skerlos, L.T., Bradley, T.M., Mackie, R.I., and White, B.A. 2002. Comparative microbial diversity in the gastrointestinal tracts of food animal species. *Society for Integrative and Comparative Biology*. 42:327-331.
- Siró, I., Kápolna, E., Kápolna, B., and Lugasi, A. 2008. Functional food. Product development, marketing and consumer acceptance - A review. *Appetite*. 51:456-467.
- Skouri, M. 1977 .Utilisation des sous produits des industries agricoles et alimentaires dans les pays Méditerranéens et du proche orient. In: *Technical Consultation on New Feed Resources*, Rome. FAO Animal Production and Health Papers. 4: 163–171.
- Smith, R.H., McAllan, A.B. 1970. Nucleic acid metabolism in the ruminant. 2. Formation of microbial nucleic acid in the rumen in relation to the digestion of food nitrogen, and the fate of dietary nucleic acids. *British Journal of Nutrition*. 24: 545-556.
- Smith, R.H., Mcallan, A.B., Hewit, D., and Lewis, P.E. 1978. Estimation of amounts of microbial and dietary nitrogen compounds entering the duodenum of cattle. *Journal of Agricultural Science*. 90:557-568.
- Smith, C.J., and Osborn, A.M. 2009. Advantages and limitations of quantitative PCR (Q-PCR)-based approaches in microbial ecology. *FEMS Microbiology Ecology*. 67: 6- 20.
- Smith, B.K., Robinson, L.E., Nam, R., and Ma, D.W.L. 2009. Trans-fatty acids and cancer: a mini- review. *British Journal of Nutrition*. 102:1254-1266.

- Snel, J., Heinen, P.P., Blok, H.J., Carman, R.J., Duncan, A.J., Allen, P.C., and Collins, M.D. 1995. Comparison of 16S rRNA sequences of segmented filamentous bacteria isolated from mice, rats, and chickens and proposal of "Candidatus Arthromitus". *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 45: 780-782.
- Sokal, R., and Michener, C.A. 1985. Statistical method for evaluating systematic relationships. *University of Kansas Science Bulletin*. 38: 1409-1438.
- Soliva, C.R., Meile, L., Ciéslak, A., Kreuzer, M., and Machmüller, A. 2004. Rumen simulation technique study on the interactions of dietary lauric and myristic acid supplementation in suppressing ruminal methanogenesis. *British Journal of Nutrition*. 92: 689–700.
- Soto-Martín, E. 2011. *Evaluación de la fermentación y la microbiota ruminal promovidas por dietas convencionales y no convencionales en caprino y en sistemas in vitro*. Tesis Doctoral. Universidad de Granada. España.
- Stackebrandt, E., and Goebel, B.M. 1994. Taxonomic Note: A Place for DNA-DNA Reassociation and 16S rRNA Sequence Analysis in the Present Species Definition in Bacteriology. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 44: 846-849.
- Steffan, R.J., and Atlas, R.M. 1991. Polymerase chain reaction: applications in environmental microbiology. *Annual Reviews in Microbiology*. 45:137-161.
- Steinfeld, H., Gerber, P., Wassenaar, T., Castel, V., Rosales, M., and de Hann, C. 2006. Livestock's long shadow: environmental issues and options. *Rome, Italy: LEAD and FAO*.
- Stern, M.D., Varga, G.A., Clark, J.H., Firkins, J.L., Huber, J.T., and Palmquist, D.L. 1994. Evaluation of chemical and physical properties of feeds that affect protein metabolism in the rumen. *Journal of Dairy Science*. 77:2762-2786.
- 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. 1977. Factors affecting cellulolytic activity of rumen contents. *Applied and Environmental Microbiology*. 33: 497-502.
- Stewart, C.S., Flint, H.J. and Bryant, M.P. 1997. The rumen bacteria. In: *The rumen microbial ecosystem*, 10-72 (Eds P. N. Hobson and C. S. Stewart). Londres, Reino Unido: Chapman and Hall.
- Stoeck, T., Kasper, J., Bunge, J., Leslin, C., Ilyin, V., and Epstein, S. 2007. Protistan diversity in the arctic: a case of paleoclimate shaping modern biodiversity? *PLoS One*. 8:62-78.
- Sun, Y.Z., Mao, S.Y., and Zhu, W.Y. 2010. Rumen chemical and bacterial changes during stepwise adaptation to a high-concentrate diet in goats. *Animal*. 4: 210-217.
- Sundset, M.A., Praesteng, K.E., Cann, I.K., Mathiesen, S.D., and Mackie, R.I. 2007. Novel rumen bacterial diversity in two geographically separated sub-species of reindeer. *Microbial Ecology*. 54: 424-438.

Capítulo 8

- 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. 2009. Molecular diversity of the rumen microbiome of Norwegian reindeer on natural summer pasture. *Microbial Ecology*. 57: 335-348.
- Sutton, L.D., Broster, W.H., Napper, D.J., and Siviter, J.W. 1985. Feeding frequency for lactating cows: effects on digestion, milk production and energy utilization. *British Journal of Nutrition*. 53:117.
- Sutton, J.D., Oldlaam, J.D., and Hart, I.C. 1980. Products of digestion, hormones and energy utilization in milking cows given concentrates containing varying proportions of barley or maize. In: *Energy metabolism*. (L. E. Mount, ed. Butterworths, London, Engl). Pag. 303
- Swain, R.A., Nolan, J.V., and Klieve, A.V. 1996. Natural and diurnal fluctuations within the bacteriophage population of the rumen. In: *Applied and Environmental Microbiology*. 62:994-997.
- Tajima, K., Aminov, R.I., Nagamine, T., Ogata, K., Nakamura, M., Matsui, H., and Benno, Y. 1999. Rumen bacterial diversity as determined by sequence analysis of 16S rDNA libraries. *FEMS Microbiology Ecology*. 29: 159-169.
- Tajima, K., Arai, S., Ogata, K., Nagamine, T., Matsui, H., Nakamura, M., Aminov, R.I., and Benno, Y. 2000. Rumen bacterial community transition during adaptation to high-grain diet. *Anaerobe*. 6: 273-284.
- Tajima, K., Nagamine, T., Matsui, H., Nakamura, M., and Aminov, R.I. 2001. Phylogenetic analysis of archaeal 16S rRNA libraries from the rumen suggests the existence of a novel group of archaeas not associated with known methanogens. *FEMS Microbiology Letters*. 200: 67-72.
- Tamminga, S. 1979. Protein degradation in the forestomachs of ruminants. *Journal of Animal Science*. 49:1615-1630.
- Tamminga, S. 1996. A review on environmental impacts of nutritional strategies in ruminants. *Journal of Animal Science*. 74:3112-3124.
- Tamminga, S., Bannink, A., Dijkstra, J., and Zom, R. 2007. *Feeding strategies to reduce methane loss in cattle*. Animal Sciences Group, Wageningen UR, Lelystad, the Netherlands. Report 34.
- Tas, B.M., and Susenbeth, A. 2007. Urinary purine derivatives excretion as an indicator of in vivo microbial N flow in cattle: A review. *Livestock Science*. 111:181-192.
- Tateno, Y., Saitou, N., Okubo, K., Sugawara, H., and Gojobori, T. 2005. DDBJ in collaboration with mass-sequencing teams on annotation. *Nucleic Acids Research*. 33: D25-D28.
- Tavendale, M.H., Meagher, L.P., Pacheco, D., Walker, N., Attwood, G.T., and Sivakumaran, S. 2005. Methane production from in vitro rumen incubations with *Lotus pedunculatus* and *Medicago sativa*, and effects of extractable condensed tannin fractions on methanogenesis. *Animal Feed Science and Technology*. 123-124: 403-419.
- Terroine, E.F., and Mourot, G. 1931. Allantoine et les corps puriques de l'urine des mammiferes proviennent-ils partiellement de la degradation des matieres protiques?. *Bulletin de la Societ  de Chimie Biologique*. 23:94-109.

- Terry, R.A., Tilley, J.M.A., and Outen, G.E. 1969. Effect of pH on cellulose digestion under in vivo conditions. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 20: 317-320.
- Thauer, R.K., Kaster, A.K., Seedorf, H., Buckel, W., and Hedderich, R. 2008. Methanogenic archaea: ecologically relevant differences in energy conservation. *Nature Reviews in Microbiology*. 6: 579-91.
- Tiemann, T.T., Lascano, C.E., Wettstein, H.R., Mayer, A.C., Kreuzer, M., and Hess, H.D. 2008. Effect of the tropical tannin-rich shrub legumes *Calliandra calothyrsus* and *Flemingia macrophylla* on methane emission and nitrogen and energy balance in growing lambs. *Animal*. 2: 790-799.
- Todaro, M., Cacciatore, T., Ferrantelli, M., Iraci, C., Leto, L., Modica, R., Mortellaro, A., Raggio, V., and Sardina, M.T. 2004. Influenza del pastazzo di limone sulle caratteristiche qualitative e quantitative del latte di pecora. In: *Proceedings in 16th National Congress of SIPAOC*, Siena, Italy, p. 331 (Abstr.).
- Tomás, C.L. 2008. Charla-debate: *La crisis mundial de los alimentos: Algunas explicaciones a partir de una mirada situacional desde América Latina, Argentina y Santa Fe*.
- Tovar-Luna, I., Goetsch, A.L., Puchala, R., Sahlu, T., Carstens, G.E., Freetly, H.C., and Johnson, Z.B. 2007. Effects of moderate feed restriction on energy expenditure by 2-year-old crossbred Boer goats. *Small Ruminant Research*. 72: 25-32.
- Tricon, S., Burdge, G.C., Kew, S., Banerjee, T., Russell, J.J., Jones, E.L., Grimble, R.F., Williams, C.M., Yaqoob, P., Calder, P.C. 2004. Opposing effects of cis-9,trans-11 and trans-10,cis-12 conjugated linoleic acid on blood lipids in healthy humans. *American Journal of Clinical Nutrition*. 80: 614-620.
- Tripathi, M.K., Chaturvedi, O.H., Karim, S.A., Singh, V.K., and Sisodiya, S.L. 2007. Effect of different levels of concentrate allowances on rumen fluid pH, nutrient digestion, nitrogen retention and growth performance of weaner lambs. *Small Ruminant Research*. 72:178-186.
- Troegeler-Meynadier, A., Bret-Bennis, L., and Enjalbert, F. 2006. Rates and efficiencies of reactions of ruminal biohydrogenation of linoleic acid according to pH and polyunsaturated fatty acids concentrations. *Reproduction Nutrition Development*. 46: 713-724
- Tsiplakou, E., and Zervas, G. 2008. Comparative study between sheep and goats on rumenic acid and vaccenic acid in milk fat under the same dietary treatments. *Livestock Science*. 119:87-94.
- Tufarelli, V., Dario, M., and Laudadio, V. 2009. Forage to concentrate ratio in Jonica breed goats: influence on lactation curve and milk composition. *Journal of Dairy Research*. 76:124-128.
- Tyburczy, C., Major, C., Lock, A.L., Destailats, F., Lawrence, P., Brenna, J.T., Salter, A.M., and Bauman D.E. 2009. Individual trans octadecenoic acids and partially hydrogenated vegetable oil differentially affect hepatic lipid and lipoprotein metabolism in golden syrian hamsters. *Journal of Nutrition*. 139:257-263.
- Urbach, G. 1990. Effect of feed on flavor in dairy foods. *Journal of Dairy Science*. 73: 3639-3650.

Capítulo 8

- Ushida, K., Jouany, J.P., and Demeyer, D.I. 1991. Effects of the presence or absence of rumen protozoa on the efficiency of utilisation of concentrate and fibrous feeds. In: *Physiological Aspects of Digestion and Metabolism in Ruminants*. (Eds T. Tsuda, Y. Sasaki and R. Kawashima). San Diego, CA, EEUU: Academic Press. 595-618.
- Vagnoni, D.B., Broderick, G.A., Clayton, M.K., and Hatfield, R.D. 1997. Excretion of purine derivatives by Holstein cows abomasally infused with incremental amounts of purines. *Journal of Dairy Science*. 80:1695-1702.
- Valadares, R.F.D., Broderick, G.A., Filho, S.C.V., Clayton, M.K. 1999. Effect of replacing alfalfa silage with high moisture corn on ruminal protein synthesis estimated from excretion of total purine derivatives. *Journal of Dairy Science*. 82:2686-2696.
- Valdes, C, Newbold, C.J., and Hillman, K. 1996. Evidence for methane oxidation in rumen fluid in vitro. *Annales Zootechnologie*. 45:351.
- Van der Gucht, K., Vandekerckhove, T., Vloemans, N., Cousin, S., Muylaert, K., Sabbe, K., Gillis, M., Declerk, S., de Meester, L., and Vyverman, W. 2005. Characterization of bacterial communities in four freshwater lakes differing in nutrient load and food web structure. *FEMS Microbiology Ecology*. 53: 205-220.
- Vanhoutte, T., Huys, G., de Brandt, E., Fahey, G.C., and Swings, J. 2005. Molecular monitoring and characterization of the faecal microbiota of healthy dogs during fructan supplementation. *FEMS Microbiology Letters*. 249: 65-71.
- Vanhoutte, T., De Preter, V., De Brandt, E., Verbeke, K., Swings, J., and Huys, G. 2006. Molecular monitoring of the fecal microbiota of healthy human subjects during administration of lactulose and *Saccharomyces boulardii*. *Applied and Environmental Microbiology*. 72: 5990-5997.
- Van Kessel, J.A.S., and Russell, J.B. 1996. The effect of pH on ruminal methanogenesis. *FEMS Microbiology Ecology*. 20: 205–210.
- Van Nevel, C.J., and Demeyer, D.I. 1977. Effect of monensin on rumen metabolism in vitro. *Applied and Environmental Microbiology*. 34: 251–257.
- Van Nevel, C.J., and Demeyer, D.I. 2004. Control of rumen methanogenesis. *Environment Monitoring and Assessment*. 42: 73–97.
- van Soest, P.J., Wine, R.H., and Moore, L.A. 1966. Estimation of the true digestibility of forages by the in vitro digestion of cell walls. *Proc. Int. Grassl. Congr.* 10: 438-441.
- Van Soest, P.J. 1982. Nutritional ecology of the ruminant: *ruminant metabolism, nutritional strategies, the cellulolytic fermentation and the chemistry of forages and plant fibers*. O and B Books, Corvallis, Oregon.
- van Soest, P.J. 1994. *Nutritional Ecology of the Ruminant*. Ithaca, NY, EEUU: Cornell University Press.
- Vasta, V., Nudda, A., Cannas, A., Lanza, M., and Priolo, A. 2008. Alternative feed resources and their effects on the quality of meat and milk from small ruminants. *Animal Feed Science and Technology*. 147: 223-246.
- Vasta, V., Makkar, H.P.S., Mele, M., and Priolo, A. 2009. Ruminal biohydrogenation as affected by tannins in vitro. *British Journal of Nutrition*. 102: 82-92.

- Ventura, M.R., Pieltain, M.C., and Castanon, J.I.R. 2009. Evaluation of tomato crop by-products as feed for goats. *Animal Feed Science and Technology*. 154: 271-275.
- Verbic, J., Chen, X.B., MacLeod, N.A., and Ørskov, E.R. 1990. Excretion of purine derivatives by ruminants. Effect of microbial nucleic acid infusion on purine derivative excretion by steers. *Journal of Agricultural Science*. 114: 243-248.
- Verité, R., and Dulphy, J.P. 1981. Effets de la nature de l'aliment concentré sur l'ingestion et les performances des vaches laitières. *Bull. Tech. C.R.Z.V. Theix, INRA*. 45:15-21.
- de Veth, M.J., and Kolver, E.S. 2001. Diurnal variation in pH reduces digestion and synthesis of microbial protein when pasture is fermented in continuous culture. *Journal of Dairy Science*. 84:2066-2072.
- Vicente, F., Guada, J.A., Surra, J., Balcells, J., and Castrillo, C. 2004. Microbial contribution to duodenal purine flow in fattening cattle given concentrate diets, estimated by purine N labelling (¹⁵N) of different microbial fractions. *Animal Science*. 78:159-167.
- Vlaeminck, B., Fievez, V., Demeyer, D., and Dewhurst, R.J. 2006. Effect of forage: concentrate ratio on fatty acid composition of rumen bacteria isolated from ruminal and duodenal digesta. *Journal of Dairy Science*. 89:2668-2678.
- Volanis, M., Zoiopoulos, P., and Tzerakis, K. 2004. Effects of feeding ensiled sliced oranges to lactating dairy sheep. *Small Ruminant Research*. 53: 15-21.
- Waghorn, G.C., Ulyatt, M.J., John, A., and Fisher, M.T. 1987. The effect of condensed tannins on the site of digestion of amino acids and other nutrients in sheep fed on *Lotus corniculatus* L. *British Journal of Nutrition*. 57:115-126.
- Wainman, F.W., Dewey, P.J.S., and Boyne, A.W. 1981. *Compound feeding stuffs for ruminants*. Rowett Research Institute for the Feedingstuffs Evaluation Unit.
- Wakelin, S.A., Macdonald, L.M., Rogers, S.L., Gregg, A.L., Bolger, T.P., and Baldock, J.A. 2008. Habitat selective factors influencing the structural composition and functional capacity of microbial communities in agricultural soils. *Soil Biology and Biochemistry*. 40: 803-813.
- Wakita, M., and Hoshino, S. 1989. Quantitative observation of starch accumulation and degradation by rumen ciliates genus *Entodinium* *in vitro* and *in vivo*. *Japanese Journal of Zootechnical Science*. 60: 1-6.
- Wales, W.J., Kolver, E.S., Thorne, P.L., and Egan, A.R. 2004. Diurnal variation in ruminal pH on the digestibility of highly digestible perennial ryegrass during continuous culture fermentation. *Journal of Dairy Science*. 87:1864-1871.
- Wallace, R.J., and Cotta, M.A. 1988. Metabolism of nitrogen-containing compounds. In: *The Rumen Microbial Ecosystem* (Ed. P.N. Hobson). Elsevier Applied Science. UK. 217-249.
- 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.
- Wallace, R.J., McKain, N., Shingfield, K.J., and Devillard, E. 2007. Isomers of conjugated linoleic acids are synthesized via different mechanisms in ruminal digesta and bacteria. *Journal of Lipid Research*. 48:2247-2254.

Capítulo 8

- Wang, Y., Waghorn, G.C., McNabb, W.C., Barry, T.N., Hedley, M.J., and Shelton, I.D. 1996. Effect of condensed tannins in *Lotus corniculatus* upon the digestion of methionine and cysteine in the small intestine of sheep. *Journal of Agricultural Science*. 127: 413–421.
- Wang, Y.H., Xu, M., Wang, F.N., Yu, Z.P., Yao, J.H., Zan, L.S., and Yang, F.X. 2009. Effect of dietary starch on rumen and small intestine morphology and digesta pH in goats. *Livestock Science*. 122:48-52.
- Wedlock, D.N., Pedersen, G., Denis, M., Dey, D., Janssen, P.H., and Buddle, B.M. 2010. Development of a vaccine to mitigate greenhouse gas emissions in agriculture: vaccination of sheep with methanogen fractions induces antibodies that block methane production in vitro. *New Zealand Veterinary Journal*. 58: 29–36.
- Weimer, P.J., Waghorn, G.C., Odt, C.L., and Mertens, D.R. 1999. Effect of diet on populations of three species of ruminal cellulolytic bacteria in lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*. 82: 122-134.
- Weiss, W.P., Frobose, D.L., and Koch, M.E. 1997. Wet tomato pomace ensiled with corn plants for dairy cows. *Journal of Dairy Science*. 80: 2896-2900.
- Weston, R.H., and Hogan, J.P. 1968. The digestion of pasture plants by sheep. I. Ruminal production of volatile fatty acids by sheep offered diets of ryegrass and forage oats. *Australian Journal of Agricultural Research* 19:419-432.
- Whitford, M.F., Teather, R.M., and Forster, R.J. 2001. Phylogenetic analysis of methanogens from the bovine rumen. *BMC Microbiology*. 1: 5.
- WHO. 2003. Diet, nutrition and the prevention of chronic diseases. Report of a joint WHO/FAO expert consultation. In: *World Health Organization Technical Reports Series*. Vol. 916. World Health Organization, Geneva, Switzerland.
- Williams, A.G., and Strachan, N.H. (1984). Polysaccharide degrading enzymes in microbial populations from the liquid and solid fractions of bovine rumen digesta. *Canadian Journal of Animal Science*. 64: 58-59.
- Williams, A.G., and Coleman, G.S. 1997. The rumen protozoa. In: Hobson, P.N., Stewart, C.S. (Eds.). *The Rumen Microbial Ecosystem*. Chapman and Hall, London, UK, pp. 73-139.
- Williams, A.G. 1986. Rumen holotrich ciliate protozoa. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 50: 25-49.
- Williams, C.M. 2000. Dietary fatty acids and human health. *Annales Zootechnie*. 49:165-180.
- Williams, C.M., and Burdge, G. 2006. Long-chain n-3 PUFA: plant v. marine sources. *Proceedings of the Nutrition Society*. 65: 42-50.
- Williams, Y.J., Popovski, S., and Rea, S.M. 2009. A vaccine against rumen methanogens can alter the composition of archaeal populations. *Applied and Environmental Microbiology*. 75: 1860–1866.
- Woese, C.R., and Fox, G.E. 1977. Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 74: 5088-5090.

- Woese, C.R., Kandler, O., and Wheelis, M.L. 1990. Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 87: 4576-4579.
- Wood, T.A., Wallace, R.J., and Rowe, A. 2009. Encapsulated fumaric acid as a feed ingredient to decrease ruminal methane emissions. *Animal Feed Science and Technology*. 152: 62–71.
- Woodward, S.L., Waghorn, G.C., Watkins, K.A., and Bryant, M.A. 2009. Feeding birdsfoot trefoil (*Lotus corniculatus*) reduces the environmental impacts of dairy farming. *Production*. 69:179–183.
- Woolley, A.T., and Mathies, R.A. 1995. Ultra-high-speed DNA sequencing using capillary electrophoresis chips. *Analytical Chemistry*. 67:3676–3680.
- Wright, A.D.G., Dehority, B.A., and Lynn, D.H. 1997. Phylogeny of the rumen ciliates Entodinium, Epidinium and Polyplastron (Litostomatea: *Entodiniomorphida*) inferred from small subunit ribosomal RNA sequences. *Journal of Eukaryotic Microbiology*. 44: 61-67.
- Wright, A.D.G. 1999. Analysis of intraspecific sequence variation among eight isolates of the rumen symbiont. *Isotricha prostoma* (Ciliophora), from two continents. *Journal of Eukaryotic Microbiology*. 46: 445-446.
- Wright, A.D.G., Williams, A.J., Winder, B., Christophersen, C.T., Rodgers, S.L., and Smith, K.D. 2004a. Molecular diversity of rumen methanogens from sheep in Western Australia. *Applied and Environmental Microbiology*, 70: 1263.
- Wright, A.D.G., Kennedy, P., and O'Neill, C.J. 2004b. Reducing methane emissions in sheep by immunization against rumen methanogens. *Vaccine*. 22: 3976–3985.
- Wright, A.D.G., Toovey, A.F., and Pimm, C.L. 2006. Molecular identification of methanogenic archaea from sheep in Queensland, Australia reveal more uncultured novel archaea. *Anaerobe*. 12: 134-139.
- Wright, A.D. G., Auckland, C.H., and Lynn, D.H. 2007. Molecular diversity of methanogens in feedlot cattle from Ontario and Prince Edward Island, Canada. *Applied and Environmental Microbiology*, 73: 4206-4210.
- Wright, A.D.G., Ma, X., and Obispo, N.E. 2008. *Methanobrevibacter* phylotypes are the dominant methanogens in sheep from Venezuela. *Microbial ecology*. 56: 390-394.
- Wright, A.D.G., Northwood, K.S., and Obispo, N.E. 2009. Rumen-like methanogens identified from the crop of the folivorous South American bird, the *hoatzin* (*Opisthocomus hoazin*). *ISME J*. 3: 1120–1126.
- Wright, A.D.G., and Klieve, A.V. 2011. Does the complexity of the rumen microbial ecology preclude methane mitigation? *Animal Feed Science and Technology*, 166-167: 248-253.
- Woese, C.R., Kandler, O., and Wheelis, M.L. 1990. Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 87: 4576-4579.

Capítulo 8

- Yáñez-Ruiz, D.R. 2003. *Utilización digestiva de dietas a base de orujo de dos fases y hoja de olivo en ovino y caprino. Efecto de factores no nutritivos*. Tesis Doctoral. Universidad de Córdoba. España.
- Yáñez-Ruiz, D.R., Moumen, A., Martín-García, A.I., and Molina-Alcaide, E. 2004a. Ruminal fermentation and degradation patterns, protozoa population, and urinary purine derivatives excretion in goats and wethers fed diets based on two-stage olive cake: Effect of PEG supply. *Journal of Animal Science*. 82:2023-2032.
- Yáñez-Ruiz, D.R., Martín-García, A.I., Moumen, A., and Molina-Alcaide, E. 2004b. Ruminal fermentation and degradation patterns, protozoa population and urinary purine derivatives excretion in goats and wethers fed diets based on olive leaves. *Journal of Animal Science*. 82:3006-3014.
- Yáñez-Ruiz, D. R., Scollan, N.D., Merry, R.J., and Newbold, C.J. 2006. Contribution of rumen protozoa to duodenal flow of nitrogen, conjugated linoleic acid and vaccenic acid in steers fed silages differing in their water-soluble carbohydrate content. *British Journal of Nutrition*. 96: 861-869.
- Yáñez-Ruiz, D.R., Martín-García, A.I., Belanche, A., Pinloche, E., Hart, K.J., and Newbold, C.J. 2007. Efecto de la ausencia de protozoos sobre la población microbiana del rumen. In: *I Simposio Avances Metodológicos en Microbiología Digestiva*, 28-30. Zaragoza, España: Asociación Interprofesional para el Desarrollo Agrario.
- Yáñez-Ruiz, D.R., and Molina-Alcaide, E. 2007. A comparative study of the effect of two-stage olive cake added to alfalfa on digestion and nitrogen losses in sheep and goats. *Animal*. 1:227-232.
- Yáñez-Ruiz, D.R., and Molina-Alcaide, E. 2008. A comparative study of nutrients utilization, alkaline phosphatase activity and creatinine concentration in the serum of sheep and goats fed diets based on olive leaves. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*. 92:141-148.
- Yáñez-Ruiz, D.R., Macías, B., Pinloche, E., and Newbold, C.J. 2010. The persistence of bacterial and methanogenic archaeal communities residing in the rumen of young lambs. *FEMS Microbiology Ecology*. 72:272-278.
- Yang, W.Z., Beauchemin, K.A., and Rode, L.M. 2001a. Effect of dietary factors on distribution and chemical composition of liquid-or solid-associated bacterial populations in the rumen of dairy cows. *Journal of Animal Science*. 79: 2736-2746.
- Yang, W.Z., Beauchemin, K.A., and Rode, L.M. 2001b. Effects of grain processing, forage to concentrate ratio, and forage particle size on rumen pH and digestion by dairy cows. *Journal of Dairy Science*. 84:2203-2216.
- Yang, C., Mills, D., Mathee, K., Wang, Y., Jayachandran, K., Sikaroodi, M., Gillevet, P., Entry, J., and Narasimhan, G. 2006. An ecoinformatics tool for microbial community studies: Supervised classification of Amplicon Length Heterogeneity (ALH) profiles of 16S rRNA. *Journal of Microbiological Methods*. 65: 49-62.

- Yang, L.Y., Chen, J., Cheng, X.L., Xi, D.M., Yang, S.L., Deng, W.D. 2010a. Phylogenetic analysis of 16S rRNA gene sequences reveals rumen bacterial diversity in Yaks (*Bos grunniens*). *Molecular Biology Reports*. 37:553-362.
- Yang, S., Ma, S., Chen, J., Mao, H., He, Y., and Xi, D. 2010b. Bacterial diversity in the rumen of Gayals (*Bos frontalis*), Swamp buffaloes (*Bubalus bubalis*) and Holstein cow as revealed by cloned 16S rRNA gene sequences. *Molecular Biology Reports*. 37: 2063-2073.
- Youssef, N., Sheik, C.S., Krumholz, L.R., Najar, F.Z., Roe, B.A., and Elshahed, M.S. 2009. Comparison of species richness estimates obtained using nearly complete fragments and simulated pyrosequencing-generated fragments in 16S rRNA gene-based environmental surveys. *Applied and Environmental Microbiology*. 75: 5227-5236.
- Yu, L., Adams, D., and Watkins, B.A. 2003. Comparison of commercial supplements containing conjugated linoleic acids. *Journal of Food Composition and Analysis*. 16:419-428.
- Yu, Z., and Morrison, M. 2004. Comparisons of different hypervariable regions of *rrs* genes for use in fingerprinting of microbial communities by PCR-denaturing gradient gel electrophoresis. *Applied and Environmental Microbiology*. 70: 4800-4806.
- Yu, Z., Yu, M., and Morrison, M. 2006. Improved serial analysis of V1 ribosomal sequence tags (SARST-V1) provides a rapid, comprehensive, sequence-based characterization of bacterial diversity and community composition. *Environmental Microbiology*. 8: 603-611.
- Zebeli, Q., Tafaj, M., Weber, I., Steingass, H., and Drochner, W. 2008. Effects of dietary forage particle size and concentrate level on fermentation profile, in vitro degradation characteristics and concentration of liquid- or solid-associated bacterial mass in the rumen of dairy cows. *Animal Feed Science and Technology*. 140:307-345.
- Zhang, R.H., Mustafa, A.F., and Zhao, X. 2006. Effects of feeding oilseeds rich in linoleic and linolenic fatty acids to lactating ewes on cheese yield and on fatty acid composition of milk and cheese. *Animal Feed Science and Technology*. 127: 220-233.
- Zhou, M., Hernandez-Sanabria, E., and Guan, L.L. 2010. Characterization of variation in rumen methanogenic communities under different dietary and host feed efficiency conditions, as determined by PCR-Denaturing Gradient Gel Electrophoresis analysis. *Applied and Environmental Microbiology*. 76: 3776-3786.
- Zhu, L., Wu, Q., Dai, J., Zhang, S., and Wei, F. 2011. Evidence of cellulose metabolism by the giant panda gut microbiome. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 108: 17714-17719.
- Zinn, R.A., and Owens, F.N. 1986. A rapid procedure for purine measurement and its use for estimating net ruminal protein synthesis. *Canadian Journal of Animal Science*. 66:157-166.

Capítulo 8

- Zoetendal, E.G., Collier, C.T., Koike, S., Mackie, R.I., and Gaskins, H.R. 2004. Molecular ecological analysis of the gastrointestinal microbiota: a review. *The Journal of Nutrition*. 134: 465-472.
- Zuckerkindl, E., and Pauling, L. 1962. Molecular disease, evolution, and genetic heterogeneity. In: *Horizons in Biochemistry* (Eds M. Kasha and B. Pullman). Nueva York, EEUU: Academic Press.189–225.
- Zuckerkindl, E., and Pauling L. 1965. Molecules as documents of evolutionary history. *Journal of Theoretical Biology*. 8:357-366.