

**UAB**

Universitat Autònoma de Barcelona  
Departament de Ciència Animal i dels Aliments

**Estrategias alternativas al uso de antibióticos  
para prevenir la aparición de trastornos digestivos  
en terneros de engorde**



**Diego Moya Fernández**

Febrero 2011



**Estrategias alternativas al uso de antibióticos para prevenir la  
aparición de trastornos digestivos en terneros de engorde**

Tesis doctoral presentada por  
**DIEGO MOYA FERNÁNDEZ**

Dirigida por  
**DR. SERGIO CALSAMIGLIA BLANCAFORT**

Realizada en el  
**DEPARTAMENT DE CIÈNCIA ANIMAL I DELS ALIMENTS**

Para acceder al grado de Doctor en el  
programa de Producción Animal de la  
**UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE BARCELONA**

Bellaterra, Febrero 2011



**SERGIO CALSAMIGLIA BLANCAFORT**, como Catedrático del *Departament de Ciència Animal i dels Aliments* de la *Facultat de Veterinària de la Universitat Autònoma de Barcelona*,

CERTIFICO:

Que la memoria titulada "**Estrategias alternativas al uso de antibióticos para prevenir la aparición de trastornos digestivos en terneros de engorde**", presentada por **Diego Moya Fernández**, ha sido realizada bajo mi dirección y, considerándola finalizada, autorizo su presentación para que sea juzgada por la comisión correspondiente.

Y para que conste a los efectos que correspondan, firmo el presente certificado en Bellaterra, 20 de Diciembre de 2010.

Edificio V, Campus UAB – 08193 Bellaterra (Cerdanyola del Vallès)

Barcelona, España

Telf: 93 581 10 91. Fax: 93 581 20 06

[d.c.animal.aliments@uab.es](mailto:d.c.animal.aliments@uab.es)

[www.uab.es](http://www.uab.es)



El autor de esta memoria ha percibido una beca  
para la formación y contratación de personal novel investigador (FI)  
de la Generalitat de Catalunya.





Quan surts per fer el viatge cap a Ítaca,  
has de pregar que el camí sigui llarg,  
ple d'aventures, ple de coneixences.  
Has de pregar que el camí sigui llarg,  
que siguin moltes les matinades  
que entraràs en un port que els teus ulls ignoraven,  
i vagis a ciutats per aprendre dels que saben.

Tingues sempre al cor la idea d'Ítaca.  
Has d'arribar-hi, és el teu destí,  
però no forcis gens la travessia.  
És preferible que duri molts anys,  
que siguis vell quan fondegis l'illa,  
ric de tot el que hauràs guanyat fent el camí,  
sense esperar que et doni més riqueses.

Ítaca t'ha donat el bell viatge,  
sense ella no hauries sortit.  
I si la trobes pobra,  
no és que Ítaca t'hagi enganyat.  
Savi, com bé t'has fet,  
sabràs el que volen dir les Itagues.

*Fragmento de la cançión "Itaca"*

*Lluís LLach (Viatge a Itaca)*





## ***Agradecimientos***

El agradecimiento más especial es para toda mi familia, encabezada por mis padres y hermano, por ofrecerme siempre vuestro más sincero amor y dedicación en todo momento, sin los cuales jamás habría llegado donde estoy ahora. Y para Pili, por mostrarme su infinito amor y comprensión en cada uno de mis pasos, por hacerme sentir alguien especial cada día, y por los años que llevamos y los que nos quedan por vivir. Sin ti, nada de esto tendría sentido. Soy lo que soy gracias a vosotros.

Además, han sido muchas personas las que, de una manera u otra, me han ayudado a alcanzar este momento. Seguramente, muchas más de las que nombraré. A todas ellas, muchísimas gracias por haber estado conmigo en el momento justo y en el sitio adecuado.

A mi director de tesis, Sergio Calsamiglia, por darme la oportunidad de iniciar este camino, y proporcionarme la ayuda y los consejos necesarios para llegar hasta aquí.

A Paul W. Cardozo, por ofrecerme su apoyo incondicional siempre que lo he necesitado, tanto dentro como fuera del trabajo.

A todos aquellos que han sido esenciales en la realización de esta tesis, aportando su granito de arena de una forma u otra: Alfred Ferret, Marta Blanch, Mari Carmen Fuentes, Lorena Castillejos, Luciano González, Nacho Fandiño, Marthali Arcos, María Rodríguez, Sara Cavini, Glauber Faleiro, Montse Cerrato; Faust Ferrer, Carles Montoro; Blas Sánchez, Carmen Martínez, Rosa Armengol; y a todo el personal de *Administració i Serveis del Departament de Ciència Animal i dels Aliments* y del *Servei de Granges Experimentals*.

A todos los compañeros de viaje del despacho y alrededores, sin los que nada de esto habría valido la pena: Amine Bouattour, Feliu López, Roser Romaguera, María Catalá, Montse Roura, Andreas Foskolos, Vincent Robles, Cristóbal Flores, Francesc Molist, Sergio Iraira, Cristina Madruga, Marta Fina, Cecilia Esquivelzeta, Adriana Siurana, Mohsen Sari, Sondes Hammami, Aída Casanovas, Ana Fortaleza, Rafa Canonenco y todos los integrantes del SNIBA. También un recuerdo especial para David Mercadal y Santiago Reynal.

A la gente del *Agriculture and Agri-Food Canada*, que me acogió de la mejor manera durante mi estancia en Lethbridge: Karen Schwartzkopf-Genswein, Reka Silasi, Fiona Brown, Michelle Bryan y Tracey Greer.

Y a todos los amigos que me acompañan desde antes del doctorado, que han estado a mi lado en los buenos y en los malos momentos, y que me han alegrado enormemente el día a día: Alberto, Alfonso, Ana, Ana Balaguer, Ángel, Fernando, Inma, Javi, Jenny, Joan, Jonathan, Jordi, Marcos, María, Marta, Mireia, Nilo, Oscar, Puri, Rubén, Sergio y Silvia.



## LISTA DE ABREVIACIONES

### *Castellano*

**AA:** Aminoácidos  
**AGV:** Ácidos grasos volátiles  
**AGVR:** Ácidos grasos volátiles ramificados  
**BS:** Bicarbonato sódico  
**CL:** Cultivo de levaduras  
**DCAD:** Diferencial cation-anión dietario  
**EH:** Extractos de hongos  
**ESPM:** Eficiencia de síntesis de proteína microbiana  
**FAD:** Fibra ácido-detergente  
**FND:** Fibra neutro-detergente  
**GMD:** Ganancia media diaria  
**IMS:** Ingesta de materia seca  
**LV:** Levaduras vivas  
**MO:** Materia orgánica  
**MOTD:** Materia orgánica total digerida  
**MS:** Materia seca  
**PAC:** Política agraria común  
**PB:** Proteína bruta  
**PV:** Peso vivo  
**SCS:** Sesquicarbonato de sodio  
**UFC:** Unidades formadoras de colonia

### *Inglés*

**ADF:** Acid detergent fiber  
**ADG:** Average daily gain  
**aNDF:** Amylase-treated neutro detergent fiber  
**BCVFA:** Branched chain volatile fatty acids  
**BSE:** Bovine spongiform encephalopathy  
**BW:** Body weight  
**CFU:** Colony forming units  
**CO<sub>2</sub>:** Carbon dioxide  
**CP:** Crude protein  
**DMI:** Dry matter intake  
**HCl:** Hydrogen chloride  
**M:** Molarity  
**Mcal:** Megacalories  
**N:** Nitrogen  
**NaOH:** Sodium hydroxide  
**NDF:** Neutro detergent fiber  
**NEg:** Net energy for growth  
**NE<sub>m</sub>:** Net energy for maintenance  
**NH<sub>3</sub>:** Ammonia  
**NSC:** Non-structural carbohydrates  
**pCO<sub>2</sub>:** Partial pressure of carbon dioxide  
**PCV:** Packed cell volume  
**SARA:** Subacute ruminal acidosis  
**SEM:** Standard error mean  
**TMR:** Total mixed ratio  
**VFA:** Volatile fatty acids



## RESUMEN

Un experimento *in vitro* y dos *in vivo* se han llevado a cabo para explorar diferentes alternativas a los antibióticos promotores del crecimiento y reducir la incidencia de trastornos digestivos. En el primer experimento se usaron 8 fermentadores de doble flujo continuo, en un diseño factorial 2 x 2 durante dos periodos de 9 días (6 para adaptación y 3 para muestreo), para determinar el efecto de las levaduras vivas y el tipo de cereal sobre la fermentación microbiana ruminal y la digestibilidad de nutrientes. Los factores principales fueron las levaduras vivas (Levucell®SC): sin adición (**NY**) vs  $2 \times 10^7$  UFC de levaduras/g de dieta (**LY**); y el tipo de cereal predominante en la dieta: concentrado de maíz (**CO**) vs concentrado de cebada (**BA**). El tratamiento BA aumento ( $P < 0.05$ ) la digestión de la materia orgánica, la proporción de valerato, las fracciones de péptidos y N amoniacal, flujo de N amoniacal, degradación de proteína bruta y el número de copias de *M. elsdenii*; y redujo ( $P < 0.05$ ) la digestión de la fibra neutro detergente, la proporción de propionato, la concentración de los ácidos graso volátiles ramificados (AGVR), la fracción de N aminoacídico, y el flujo de N no amoniacal. El tratamiento LY aumentó ( $P < 0.01$ ) los AGVR, y redujo ( $P < 0.05$ ) el flujo y la fracción de N amoniacal, y el número de copias de *S. bovis*. El tratamiento LY redujo ( $P < 0.05$ ) la pendiente de caída del pH, el área bajo pH 6.0, y la producción de gas; mientras que tendió ( $P < 0.10$ ) a aumentar los minutos hasta el pH mínimo, aunque solo con la dieta BA. Estos resultados sugieren beneficios potenciales de LY en la estabilización de la fermentación de dietas ricas en cebada. En el segundo experimento, se evaluaron los efectos de un cambio brusco de dieta para inducir trastornos digestivos y la suplementación con cultivo de levaduras sobre la fermentación microbiana ruminal, usando 12 terneros Holstein con cánula ruminal, en un diseño *crossover* de dos periodos de 5 semanas. En cada periodo, tras 3 semanas de adaptación a una dieta 100% forrajera, se aumentó la proporción de concentrado en 2,5 kg/d (en materia fresca) durante 4 días, hasta alcanzar una dieta 10:90 de forraje:concentrado, y entonces se mantuvo durante 10 días más. Los tratamientos empezaron el primer día de cada periodo, y fueron un a dieta control (**CL**) o la misma dieta con la adición de cultivo de levaduras (**YC**, Diamond V XPCLS™). Un



total de 20 casos (83,3%) de trastornos digestivos se registraron en ambos periodos durante el cambio brusco de dieta, todos ellos diagnosticados por una reducción en la ingesta. El perfil de fermentación ruminal a las 0 h del día del trastorno digestivo se caracterizaba por un bajo pH ruminal, el cual había permanecido bajo 6,0 más de 18 h, acompañado por una concentración elevada de AGV y, en algunos casos, por una elevada concentración de láctico. La adición de YC no afectó a la incidencia (10 casos por tratamiento) o al tiempo transcurrido hasta el trastorno ( $7,00 \pm 0.62$  d). Sin embargo, YC redujo ( $P < 0.05$ ) la capacidad espumante el día tras el trastorno digestivo, apuntando beneficios potenciales en la reducción del riesgo de desarrollar timpanismo. Por tanto, el diseño propuesto resultó efectivo causando trastornos digestivos, pero la adición de YC no tuvo un impacto significativo sobre la fermentación ruminal. En el último experimento, 80 terneros de engorde fueron usados durante 52 días con un diseño de bloques al azar generalizados, para evaluar si la selección individual de ingredientes modula el pH ruminal y mejora la función ruminal. Los tratamientos fueron: una ración totalmente mezclada (**TMR**) (85% concentrado de cebada (**BG**), 10% ensilado de maíz (**CS**), 5% suplemento); o dietas a libre elección (**FC**) entre concentrado de cebada y ensilado de maíz (**BGCS**); granos de destilería de trigo (**DG**) y concentrado de cebada (**BGDG**); o ensilado de maíz y granos de destilería de trigo (**CSDG**). Las terneras alimentadas con TMR hicieron comidas más cortas ( $P = 0.01$ ) y más pequeñas ( $P = 0.03$ ) que aquellas alimentadas con dietas FC. Los animales alimentados con BGCS y BGDG aumentaron ( $P < 0.01$ ) la proporción de BG a lo largo del experimento hasta alcanzar un 80 y un 70% respectivamente. Este aumento de BG se explica por un incremento ( $P < 0.01$ ) del ritmo de ingesta pero manteniendo el mismo tiempo de ingesta ( $P > 0.10$ ), el cual se acompaña de un aumento del ritmo pero una disminución del tiempo de ingesta tanto de CS como de DG. Aún con el aumento del consumo de BG, el pH ruminal y el perfil de AGV no fueron diferentes entre dietas FC y TMR. Los animales alimentados con CSDG consumieron DG en un 60% del total ingerido en materia seca a lo largo del experimento, resultando en un mayor ( $P < 0.05$ ) pH ruminal medio y ratio acético:propiónico, y una menor ( $P < 0.05$ ) área bajo la curva que aquellos

animales alimentados con otras dietas FC o TMR. Los resultados sugieren que terneros de engorde alimentados con dietas FC que contengan BG autorregulan la ingesta y mantienen un perfil fermentativo ruminal similar que aquellos alimentados con dietas TMR.



## SUMMARY

One in vitro and two in vivo experiments were conducted to evaluate the alternatives to antibiotic growth promoters in order to reduce the incidence of digestive upsets. In the first experiment, 8 dual flow continuous culture fermenters were used in a 2 x 2 factorial design in two replicated periods of 9 days (6 for adaptation and 3 for sampling) to determine the effect of live yeast and type of cereal on rumen microbial fermentation and nutrient digestibility. Main factors were live yeast (Levucell<sup>®</sup>SC): no yeast (**NY**) vs  $2 \times 10^7$  CFU of yeast/g of diet (**LY**); and type of predominant cereal in the diet: corn concentrate (**CO**) vs barley concentrate (**BA**). Treatment BA increased ( $P < 0.05$ ) organic matter digestion, valerate proportion, peptides and ammonia N fractions, ammonia N flow, crude protein degradation, and copies of *M. elsdenii*; and decreased ( $P < 0.05$ ) neutro detergent fiber digestion, propionate proportion, branched chain volatile fatty acid (BCVFA) concentration, aminoacid-N fraction, and non-ammonia N flow. Treatment LY increased ( $P < 0.01$ ) BCVFA, and decreased ( $P < 0.05$ ) ammonia N fraction and flow, and copies of *S. bovis*. Treatment LY decreased ( $P < 0.05$ ) the slope of pH drop, the area under pH 6.0, and the gas production, and tended ( $P < 0.10$ ) to increase the minutes until minimum pH, but only with the BA diet. These results suggested potential benefits of LY in stabilizing the fermentation of barley-based diets. In the second experiment, we evaluated the effects of a dietary challenge to induce digestive upsets and supplementation with yeast culture on rumen microbial fermentation, by using 12 Holstein heifers fitted with ruminal cannula, in a crossover design with 2 periods of 5 wk. In each period, after 3 wk of adaptation to a 100% forage diet, the dietary challenge consisted of increasing the amount of grain at a rate of 2.5 kg/d (as-fed basis) over a period of 4 d, until a 10:90 forage:concentrate diet was reached, and then it was maintained for 10 d. Treatments started the first day of each period, and they were a control diet (**CL**) or the same diet with addition of yeast culture (**YC**, Diamond V XPCLS). A total of 20 cases (83.3%) of digestive upsets were recorded in both periods during the dietary challenge, all diagnosed due to a reduction in feed intake. Rumen fermentation profile at 0 h on the digestive upset day was characterized by low ruminal pH, which

remained under 6.0 for 18 h, accompanied by high total VFA concentration and, in some cases, by high lactate concentration. Addition of YC during the dietary challenge did not affect the incidence (10 cases per treatment) or time ( $7.00 \pm 0.62$  d) to digestive upset. However, YC reduced ( $P < 0.05$ ) the foam strength on the day after the digestive upset, suggesting potential benefits of reducing the risk of developing bloat. Therefore, the proposed dietary challenge model was successful in causing a digestive upset, as indicated by reduced feed intake, but the YC addition had no significant impact on rumen fermentation. In the last experiment, 80 crossbred beef heifers, were used in a 52-d experiment with a generalized randomized block design, to assess if self-selection of dietary ingredients modulates ruminal pH and improves rumen function of feedlot finishing cattle. Treatments were: total mixed ration (**TMR**) (85% barley-grain (**BG**), 10% corn silage (**CS**), 5% supplement); or free-choice (i.e., self-selection) (**FC**) diets of barley-grain and corn silage (**BGCS**); wheat distillers' grain (**DG**) and barley grain (**BGDG**); or corn silage and wheat distillers' grain (**CSDG**). Heifers fed TMR had shorter ( $P = 0.01$ ), and smaller ( $P = 0.03$ ) meals than those fed FC diets. Cattle fed BGCS and BGDG increased ( $P < 0.01$ ) intake of BG over time by up to 80 and 70%, respectively. Increased consumption of BG arose from an increase ( $P < 0.01$ ) eating rate over the same ( $P > 0.10$ ) feeding time, which was accompanied by an increase ( $P < 0.05$ ) in eating rate but a decrease ( $P < 0.05$ ) in feeding time of either CS or DG. Even with increased BG consumption, ruminal pH and VFA profiles were not different ( $P > 0.10$ ) among FC diets or compared with TMR. Cattle fed FC CSDG consumed DG at a level of 60 % of dietary DM over the trial, resulting in higher ( $P < 0.05$ ) mean ruminal pH and acetate to propionate ratio, and lower ( $P < 0.05$ ) area under the curve, than those given the other FC diets or the TMR. Results suggests that finishing feedlot cattle fed FC diets containing BG self-regulate intake of diets that have a similar composition, intake level and ruminal fermentation profile to those fed a TMR.





## ÍNDICE

### CAPÍTULO I. Revisión bibliográfica

1. Producción de vacuno de carne.....	1
1.1. Situación mundial.....	1
1.2. Situación en la Unión Europea.....	2
1.3. Situación en España y Cataluña.....	3
1.4. Perspectivas de futuro.....	6
2. Desequilibrios nutricionales.....	8
2.1. Acidosis.....	8
2.1.1. Etiología.....	8
2.1.2. Patogenia.....	11
2.1.3. Incidencia y repercusiones.....	12
2.2. Timpanismo.....	12
2.2.1. Etiología.....	12
2.2.2. Patogenia.....	13
2.2.3. Incidencia y repercusiones.....	14
3. Alternativas al uso de antibióticos.....	15
3.1. Antecedentes.....	15
3.2. Manejo de la alimentación.....	16
3.3. Aditivos alimentarios.....	18
3.3.1. Tampones y alcalinizantes.....	19
3.3.2. Ácidos orgánicos.....	23
3.3.3. Extractos de plantas.....	24
3.3.3.1. Taninos.....	24
3.3.3.2. Saponinas.....	25
3.3.3.3. Aceites esenciales.....	26
3.3.4. Anticuerpos.....	28
3.3.5. Aditivos microbianos.....	29
3.3.5.1. Aditivos a base de bacterias.....	29
3.3.5.2. Aditivos a base de levaduras.....	30
4. Uso de productos a base de levaduras.....	34
4.1. Antecedentes.....	34
4.2. Productos con levaduras vivas.....	35
4.3. Productos con cultivo de levaduras.....	36
4.4. Efectos sobre la fermentación ruminal.....	37
4.4.1. Productos a base de levaduras vivas.....	42
4.4.2. Productos a base de cultivo de levaduras.....	43



4.5. Conclusiones.....	45
5. Referencias bibliográficas.....	47
<b>CAPÍTULO II. Objetivos.....</b>	<b>67</b>
<b>CAPÍTULO III. Live yeast on rumen microbial fermentation.....</b>	<b>71</b>
Abstract.....	72
Introduction.....	73
Materials and methods.....	74
Apparatus and experimental design.....	74
Sampling.....	74
Chemical analyses.....	76
Statistical analyses.....	77
Results.....	78
Fermentation profile.....	78
pH of the rumen fluid.....	78
Gas production.....	79
Discussion.....	79
Effects of type of cereal on fermentation profile.....	79
Effects of yeast addition on fermentation profile.....	81
Drop of pH after feeding.....	81
Gas production.....	82
Conclusions.....	82
Reference list.....	83
Figures and tables.....	86
<b>CAPÍTULO IV. Dietary challenge with yeast culture.....</b>	<b>95</b>
Abstract.....	96
Introduction.....	97
Materials and methods.....	98
Animals.....	98
Experimental design.....	98
Sample collection and analyses.....	99
Statistical analyses.....	102
Results and discussion.....	102
Changes in ruminal fermentation during the dietary challenge.....	102
Effects of yeast culture during the dietary challenge.....	105
Conclusions.....	106

---

Reference list.....	107
Tables.....	110
<b>CAPÍTULO V. Free choice diets for beef cattle.....</b>	<b>117</b>
Abstract.....	118
Introduction.....	119
Materials and methods.....	120
Experimental design.....	120
Data collection.....	121
Statistical analyses.....	124
Results.....	124
Feed intake and behavior.....	125
Rumen fermentation profile.....	127
Blood variables.....	127
Performance and feed cost.....	128
Discussion.....	128
Feed choice and intake.....	128
Feeding behavior.....	130
Rumen fermentation profile and blood parameters.....	132
Animal performance and feed cost.....	133
Conclusions.....	134
Reference list.....	134
Tables and figures.....	139
<b>CAPÍTULO VI. Discusión general.....</b>	<b>151</b>
1. Introducción.....	151
2. Desarrollo cronológico.....	151
3. Reflexiones generales.....	154
4. Perspectivas de futuro.....	156
5. Bibliografía.....	157
<b>CAPÍTULO VII. Conclusiones.....</b>	<b>165</b>
<b>CAPÍTULO VIII. Anexos.....</b>	<b>167</b>
<b>Anexo 1.</b> Resumen de resultados descritos en los estudios con levaduras.....	<b>169</b>
<b>Anexo 2.</b> Marco en el que se origina la presente tesis doctoral.....	<b>179</b>
<b>Anexo 3.</b> Determinación del poder espumante del líquido ruminal.....	<b>183</b>
<b>Anexo 4.</b> Técnica de producción de gas y muestreo para metano.....	<b>191</b>

## ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

### CAPÍTULO I. Revisión bibliográfica

#### **Figuras**

Figura 1. Principales países productores de carne de vacuno en el 2008.....	1
Figura 2. Balanza comercial de la Unión Europea: volumen de importaciones y exportaciones.....	2
Figura 3. Origen de las importaciones de carne de vacuno de Rusia.....	3
Figura 4. Evolución del número de granjas en España respecto a 1997, según su tamaño en unidades de ganado mayor.....	5
Figura 5. Contribución del pH y del tipo de dieta a los cambios en la digestión de nutrientes, fermentación ruminal y metabolismo proteico <i>in vitro</i> .....	10
Figura 6. Evolución del uso de productos antibióticos en Dinamarca.....	15
Figura 7. Distribución por años de la mortalidad por timpanismo.....	16
Figura 8. Esquema del metabolismo del piruvato y la formación de los principales ácidos grasos en rumen.....	23
Figura 9. Media y desviación estándar de los resultados descritos en los estudios con productos a base de levaduras vivas.....	40
Figura 10. Media y desviación estándar de los resultados descritos en los estudios con productos a base de cultivo de levaduras.....	41

#### **Tablas**

Tabla 1. Distribución del tipo de estudio con levaduras por tratamiento.....	38
--	----

### CAPÍTULO III. Live yeast on rumen microbial fermentation

#### **Figuras**

Figure 1. Effect of type of cereal and yeast addition on gas production.....	91
--	----

#### **Tablas**

Table 1. Ingredient and chemical composition of the barley and corn diets.....	86
Table 2. Effect of type of cereal and yeast addition on nutrients digestibility and fermentation profile of ruminal liquid in continuous culture.....	87
Table 3. Effects of type of cereal and yeast addition on N metabolism and flow of ruminal liquid in continuous culture.....	88
Table 4. Effect of type of cereal and yeast addition on copies of 16S rRNA gene of <i>Streptococcus bovis</i> and <i>Megasphaera elsdenii</i> .....	89
Table 5. Effect of type of cereal and yeast addition on pH drop after feeding, calculated until the minute in which pH reaches its minimum value.....	90

**CAPÍTULO IV. Dietary challenge with yeast culture**

Table 1. Cumulative DMI and ruminal liquid pH of animals experiencing a digestive upset on or around the day it appeared.....	110
Table 2. Total VFA concentration, acetate to propionate ratio, and lactate (mM) and ammonia-N concentrations of animals experiencing a digestive upset on or around the day it appeared.....	111
Table 3. Copies of 16S rRNA gene of <i>Streptococcus bovis</i> and <i>Megasphaera elsdenii</i> and ruminal fluid viscosity of animals experiencing a digestive upset on or around the day it appeared.....	112
Table 4. Foam height and strength of ruminal fluid from animals experiencing a digestive upset.....	113

**CAPÍTULO V. Free choice diets for beef cattle****Figuras**

Figure 1. Dietary component preference (as % of total DMI) of each free-choice treatment, obtained individually each week over the experiment.....	146
--	-----

**Tablas**

Table 1. Dietary components and their chemical composition.....	139
Table 2. Feed intake and feeding behavior of heifers consuming TMR, BGCS, BGDG and CSDG treatments, determined individually over the experiment.....	140
Table 3. Feeding behavior of heifers consuming CS, BG and DG when offered separately in the free-choice dietary treatments.....	141
Table 4. Daily ruminal fluid pH profile determined in 16 feedlot cattle consuming TMR, BGCS, BGDG and CSDG treatments, over 4 measurement periods.....	142
Table 5. Ruminal fermentation profile determined in 16 feedlot cattle consuming TMR, BGCS, BGDG and CSDG treatments.....	143
Table 6. Blood variables determined in 16 feedlot cattle consuming TMR, BGCS, BGDG and CSDG treatments, prior to feed delivery.....	144
Table 7. Performance variables of heifers consuming TMR, BGCS, BGDG and CSDG treatments, determined individually over the experiment.....	145

**CAPÍTULO VII. Anexos****Anexo 1**

Tabla 1. Efectos de las levaduras vivas sobre parámetros productivos, digestibilidad de los alimentos y poblaciones microbianas del rumen.....	169
Tabla 2. Efectos de las levaduras vivas sobre el pH, los ácidos grasos y la concentración de N amoniacal en el rumen.....	170

Tabla 3. Efectos del cultivo de levaduras sobre parámetros productivos, digestibilidad de los alimentos y poblaciones microbianas del rumen.....171

Tabla 4. Efectos del cultivo de levaduras sobre el pH, los ácidos grasos y la concentración de N amoniacal en el rumen.....172

**Anexo 2**

Tabla 1. Resumen cronológico de los experimentos realizados en el departamento de Ciencia Animal y de los Alimentos dentro de la línea de investigación de aditivos modificadores de la fermentación ruminal.....179

Tabla 2. Resumen cronológico de los experimentos realizados en el departamento de Ciencia Animal y de los Alimentos dentro de la línea de investigación del pH ruminal.....180





**CAPÍTULO I**  
**Revisión bibliográfica**





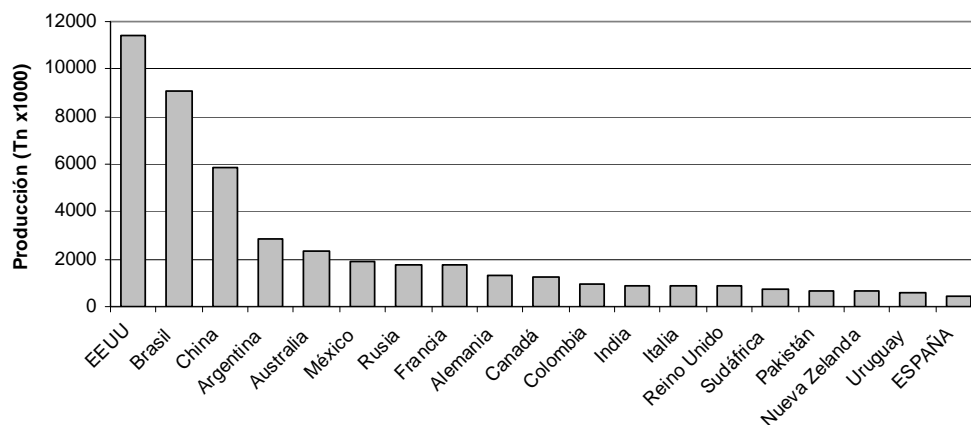
## 1. PRODUCCIÓN DE VACUNO DE CARNE

### 1.1 Situación mundial

El mercado de los productos cárnicos en general, y el sector del vacuno de carne en particular, ha sufrido importantes cambios en los últimos años. Estos se explican, en parte, por la constante evolución de los sistemas de producción en búsqueda de métodos que combinen de forma óptima productividad y sostenibilidad. Dichos cambios también tienen su origen en la reestructuración del comercio a nivel global, que ha favorecido un incremento de los intercambios internacionales, así como la eclosión de países emergentes como Brasil o China. Por otro lado, también es destacable la influencia de diferentes crisis sanitarias y alimentarias (lengua azul, BSE,...), que han provocado fluctuaciones en los mercados por el descenso de determinados consumos y restricciones impuestas por motivo de protección.

Así pues, los últimos datos sitúan a EEUU, Brasil y China como líderes mundiales en producción de carne de vacuno, copando un 42% del mercado total (Figura 1). Sin embargo, la aparición de Brasil y China en este ranking es relativamente reciente, y se debe a que en las dos últimas décadas han aumentado su productividad más de 2 y 7 veces, respectivamente.

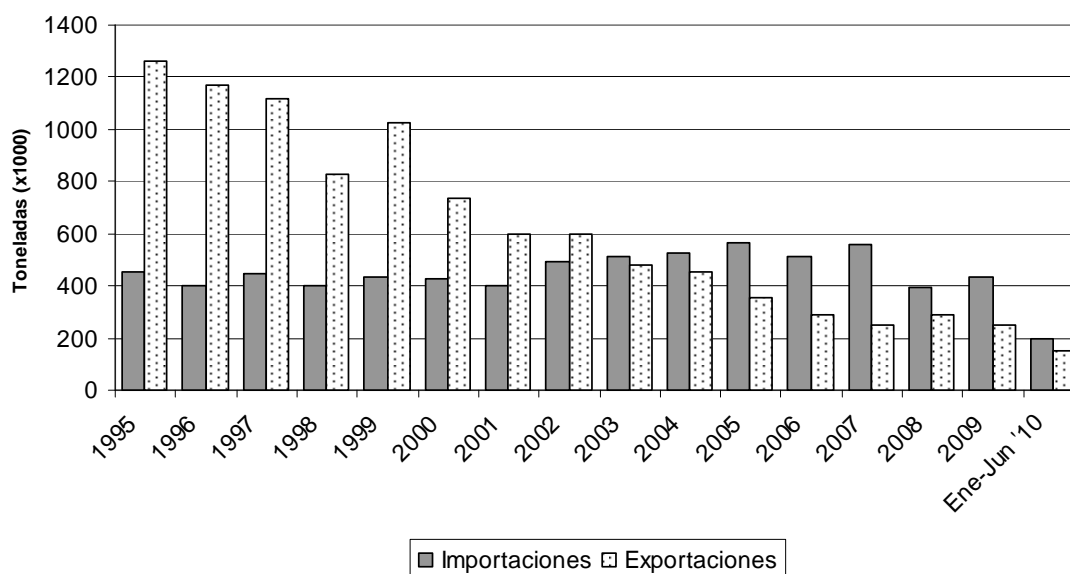
**Figura 1.** Principales países productores de carne de vacuno en el 2008 (Fuente: FAOSTAT)



## 1.2. Situación en la Unión Europea

La producción de carne de vacuno en la Unión Europea supone un 13% del mercado global, siendo Francia, Alemania, Italia, Reino Unido y España los principales productores a nivel comunitario. Sin embargo, la balanza comercial de la UE ha sufrido un importante cambio en la última década, pasando de ser claramente exportadora a convertirse desde el año 2003 en importadora neta de carne de vacuno. Si bien las importaciones se han mantenido a un nivel constante entorno a las 400.000 toneladas, las exportaciones han caído desde el año 1995 hasta el 2009 más de un 80% (Figura 2).

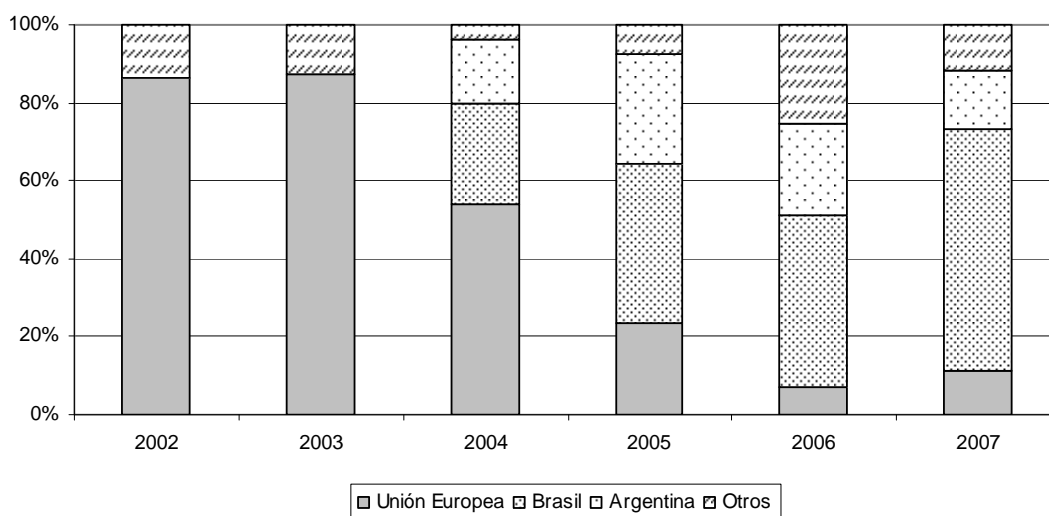
**Figura 2.** Balanza comercial de la UE: volumen de importaciones/exportaciones (Fuente: EUROSTAT)



Para explicar el porqué de este cambio en los mercados, podemos poner a Rusia como ejemplo. Históricamente, el país soviético ha sido uno de los principales destinos de las exportaciones europeas de carne de vacuno, y actualmente sigue siendo así con un 24% del volumen total exportado. Sin embargo, mientras en el año 2003 la carne de vacuno procedente de la UE suponía el 90% del volumen importado por Rusia, en el 2007 era poco más del 10%. Por el contrario, Brasil y Argentina copan

actualmente más del 75% de las importaciones rusas (Figura 3). Igual que en Rusia, hoy por hoy los principales orígenes de las importaciones de la UE son Brasil (36%) y Argentina (24%), habiendo incrementado éstos sus exportaciones hacia Europa un 70 y un 40%, respectivamente, en los últimos cinco años.

**Figura 3.** Origen de las importaciones de carne de vacuno de Rusia (Fuente: FAOSTAT)



### 1.3. Situación en España y Cataluña

En España, el sector productor de carne de vacuno está formado por dos subsectores perfectamente diferenciados. Por un lado el subsector de vacas madre, compuesto por vacas de aptitud láctea donde el ternero es un subproducto, y por vacas nodrizas cuyo objetivo es producir terneros. Por otro lado se encuentra el subsector dedicado al cebo de terneros, que se realiza en el resto de la península desligado de la tierra, en granjas próximas a los grandes núcleos de consumo, y con un sistema de engorde a base de piensos ricos en almidones rápidamente fermentables, en detrimento del aporte de fibra en la ración, permitiendo alcanzar un mayor peso en el menor tiempo posible.

El sector vacuno ocupa la tercera posición por volumen de carne producida (con un 11,4%), por detrás de la carne de cerdo (60%) y de ave

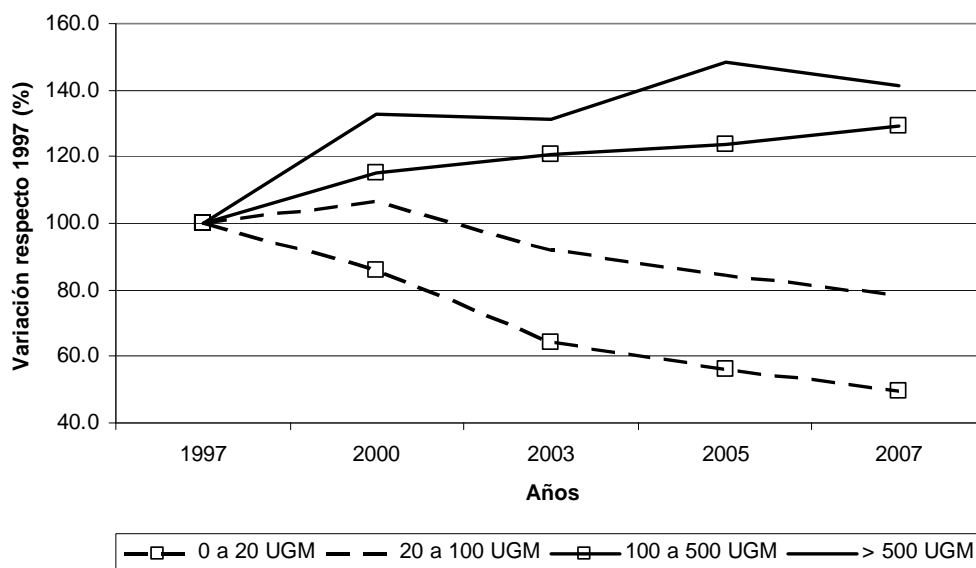
(14%). Sin embargo, la importancia de la producción bovina ha ido cayendo, en el conjunto de las carnes, desde el año 2004 (13,3%) hasta el 11,4% actual. Y es que, desde el primer semestre de 2008 hasta Noviembre del 2009 la cabaña bovina ha descendido más del 7%, situándose en los 6,08 millones de animales. Durante este periodo, los animales menores de 12 meses destinados a sacrificio presentan un descenso del 22%, las hembras de 12 a 24 meses para sacrificio descienden cerca de un 9%, y los machos de 12 a 24 meses, tanto para sacrificio como con otros destinos, sufren un descenso del 32%. Así pues, esta reducción del número de animales también se ve reflejada en un descenso del número y peso total de los animales sacrificados, que acumulan ya unas caídas desde el año 2004 del 18%.

Además, esta reducción de la cabaña bovina ha venido acompañada de una intensa reorganización de la estructura de explotaciones ganaderas. En tan solo 10 años, desde 1997 hasta 2007, han desaparecido 78.720 explotaciones con ganado bovino en España, de las que 2.340 estaban en Cataluña, lo que representa una caída del 38,8 y del 35%, respectivamente. Este descenso se explica en gran parte por la desaparición de granjas pequeñas, con menos de 100 unidades de ganado mayor, mientras que las granjas más grandes incluso han aumentado en número (Figura 4).

Tanto el número total de animales como la estructura de explotaciones se encuentran influidos por un gran número de factores, entre los que se pueden destacar:

- La superación de diferentes crisis alimentarias (como la BSE), así como las diferentes reformas legislativas referentes a la higiene de la carne, salud pública y producción animal.
- La elevada dependencia de los precios en materia de alimentación animal, quedando expuesto a las fluctuaciones del mercado y a situaciones como la escalada de precios acontecida en 2007 y 2008.

**Figura 4.** Evolución del número de granjas en España respecto a 1997, según su tamaño en unidades de ganado mayor (Fuente: EUROSTAT).



- El impacto de la llegada en Mayo de 2004 de 10 nuevos socios comunitarios a la Europa de los 15 (complementado con la adhesión en Enero de 2007 de Bulgaria y Rumania), destacando algunos de ellos como importantes productores.
- La creciente importancia de las transacciones comerciales a nivel internacional, tanto de forma multilateral, en el seno de la Organización Mundial de Comercio, como bilateral, con los principales demandantes y productores del mundo.
- La aplicación de la Política Agraria Común (PAC) y sus diferentes reformas normativas, cada vez más exigentes en la vinculación de las ayudas con la sostenibilidad, la carga ganadera y la orientación del mercado.
- Las transformaciones socioeconómicas y ambientales del mundo rural, que han propiciado un abandono de la ganadería y de la agricultura (López i Gelats, 2010).

Todos estos factores han venido marcando la tendencia vivida en los últimos años: una evolución del sector en términos de productividad, costes y rentabilidad, favoreciendo una progresiva profesionalización del sector ganadero, aún cuando en detrimento de su número.

#### **1.4. Perspectivas de futuro**

La entrada en vigor de la reforma de la PAC del 2003 (en España el 1 de Enero del 2006) muestra un progreso desde un modelo que buscaba promover la autosuficiencia y garantizar la seguridad de los alimentos, a otro que se preocupa más con temas de calidad (incluyendo los estándares de seguridad alimentaria) y el medioambiente. Además, se ha cambiado la manera en la que Europa apoya al sector ganadero introduciendo elementos como el desacoplamiento parcial o total del hecho productivo, y la condicionalidad (que supedita la percepción de las ayudas al cumplimiento de requisitos de salud pública, sanidad animal, bienestar animal y buenas prácticas ganaderas). También en este sentido, y desde el año 2006, en respuesta a la creciente preocupación de la opinión pública por presencia de residuos y/o cepas resistentes en los alimentos (Andersen y col., 2005; Thompson y col., 2007), la UE prohibió el uso de antibióticos ionóforos como promotores del crecimiento. Esta medida se unió a las que ya se habían establecido previamente para proteger la inocuidad y la salubridad de la carne de vacuno europea, mediante la prohibición de las harinas de carne y huesos en los piensos, y el uso de hormonas.

Así pues, los principales retos a los que se enfrenta actualmente el sector nacional son:

- La progresiva recuperación de la confianza del consumidor, asociado al fomento de la producción y consumo de carnes de calidad certificada.
- El aumento de cuotas de mercado de carne de vacuno, así como la protección de las cuotas de mercado ya alcanzadas frente a eventuales competidores, tanto grandes potencias internacionales como los nuevos socios comunitarios.

Alcanzar ambos objetivos pasa inevitablemente por seguir mejorando, de forma sostenible (Oenema, 2004), la competitividad del sector. En el ámbito del cebo de vacuno de carne, para mejorar el

rendimiento productivo de una explotación tenemos dos objetivos: reducir los gastos de producción y aumentar la productividad. Para ello podemos actuar a nivel de explotación, adoptando medidas como la reducción de mermas en el ciclo productivo, la optimización del manejo nutricional (Schwartzkopf-Genswein y col., 2003), o ajustando la dieta a las necesidades. Por otro lado, podemos actuar a nivel de animal a través de la alimentación. Es en este punto en el que más esfuerzos ha hecho la comunidad científica en los últimos años (Nagaraja y col., 1997; McAllister y col., 2006; Calsamiglia y col., 2008), para tratar de comprender, y en última estancia manipular, la fermentación ruminal de los alimentos, tratando de reducir sus ineficiencias y así optimizar la productividad.



## **2. DESEQUILIBRIOS NUTRICIONALES**

En el ámbito del cebo de vacuno de carne se persigue maximizar la respuesta productiva de la raza mediante dietas ricas en concentrado, con una elevada proporción de almidón rápidamente digestible, a costa de una reducción en el aporte de fibra en la ración. Con este tipo de dietas se obtienen velocidades de crecimiento elevadas pero, por el contrario, el organismo animal se lleva a situaciones límite, pudiendo incluso generar desequilibrios en la fermentación ruminal que ocasionen trastornos tales como acidosis y/o timpanismo (Owens y col., 1998; Cheng y col., 1998; Nagaraja y Titgemeyer, 2007).

### **2.1. Acidosis**

#### **2.1.1. Etiología**

La acidosis ruminal es un proceso patológico derivado de una producción y acumulación excesiva de AGV en el rumen, lo que conlleva un descenso del pH del medio ruminal hasta valores por debajo de los fisiológicos. Esta situación se da cuando nos encontramos al menos una de las siguientes condiciones:

- 1) Ingestión de dietas ricas en carbohidratos rápidamente fermentables.
- 2) Aumento de la proporción de concentrado de la dieta sin un periodo de adaptación suficiente de la microflora ruminal.

Como ya hemos dicho anteriormente, los sistemas de producción actuales optan por aumentar la energía de la ración mediante el aporte de carbohidratos, muchas veces en detrimento de la cantidad de fibra (Krause y Oetzel, 2006). Este tipo de dietas fermentan rápidamente en el rumen produciendo grandes cantidades de AGV, los cuales no pueden ser absorbidos tan rápidamente por la pared ruminal, y se acumulan en el medio reduciendo su pH. Con valores de pH por debajo de 6,0, las

poblaciones bacterianas amilolíticas y productoras de ácido láctico, como *Streptococcus bovis*, aumentan su tasa de crecimiento, liberando más AGV y láctico al medio. Además, el ácido láctico tiene un poder acidificante 10 veces mayor al resto de AGV, por lo que el descenso de pH se agrava. Con un pH por debajo de 5,5, las poblaciones bacterianas celulolíticas y protozoos prácticamente desaparecen, y el animal entra en una situación difícil de revertir si no es con ayuda externa (Nagaraja y Titgemeyer, 2007).

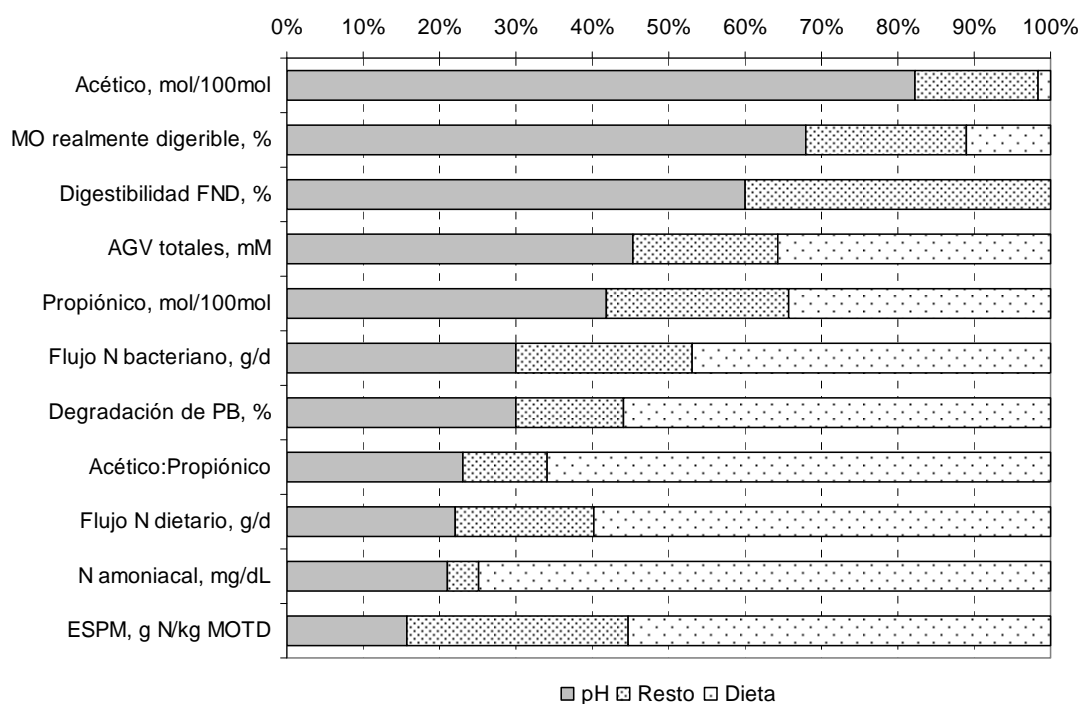
El aumento de la proporción de concentrado de la dieta sin un periodo de adaptación suficiente de la microflora ruminal puede ser también causa de acidosis. Esto es debido a que la tasa de crecimiento de las bacterias utilizadoras de láctico es menor que la de las bacterias que lo producen, por lo que, ante un aumento brusco en la cantidad de carbohidratos, la población de bacterias productoras de láctico aumentaría a mayor velocidad, favoreciendo un desequilibrio en el metabolismo del lactato que resultaría en acidosis ruminal (Huber y col., 1976). Estudios microbiológicos sugieren que sería conveniente realizar periodos de transición entre dietas, aumentando los niveles de carbohidratos progresivamente para adaptar la flora microbiana ruminal (Allison y col., 1964; Bevans y col., 2005). Por otro lado, también es conveniente una adaptación progresiva a dietas altamente fermentables para permitir el desarrollo de las papilas ruminales, y así aumentar la capacidad de absorción de la pared ruminal (Dirksen y col., 1985). Ante un aumento brusco en los carbohidratos de la ración, las papilas ruminales no estarán suficientemente desarrolladas por lo que el pH descenderá, no por el exceso de producción de AGV, sino por la incapacidad de absorberlos.

La situación se agrava cuando a todo esto se suma una reducción en la fibra efectiva de la ración, reduciendo así el porcentaje de materia seca, el tamaño de partícula y el tiempo de rumia. Todo esto afecta negativamente la producción de saliva (Nocek, 1994), de la cual depende principalmente la capacidad tamponante del líquido ruminal (Van Soest, 1982). Algunos autores han estimado que la saliva puede neutralizar

aproximadamente entre el 30 y el 50% del total de los AGV producidos en el rumen (Kay, 1966; Allen, 1997).

Así pues, los factores que determinan la aparición de acidosis suelen darse a la vez, existiendo un efecto confundido entre qué es consecuencia de un exceso de carbohidratos y qué lo es debido a un pH ruminal bajo. Calsamiglia y col. (2008) diseñaron un experimento con un sistema de fermentación *in vitro* para determinar si los efectos observados a nivel ruminal al ingerir dietas ricas en concentrado son debidos a la reducción del pH, o al tipo de sustrato fermentado. Los resultados indicaron que los efectos sobre la digestibilidad de la MO, de la fibra, y la proporción molar de acético están relacionados principalmente con pH ruminal; los cambios observados en la proporción molar de propiónico y la concentración total de AGV están relacionados tanto con el pH como con el tipo de dieta; mientras que los efectos sobre parámetros relacionados con el N están más asociados al tipo de dieta (Figura 5).

**Figura 5.** Contribución del pH y del tipo de dieta a los cambios en la digestión de nutrientes, fermentación ruminal y metabolismo proteico *in vitro* (adaptado de Calsamiglia y col., 2008)



Esto confirma la hipótesis de que los efectos observados durante un proceso de acidosis son debidos a un efecto combinado del pH y del tipo de dieta, e incluso una parte de ellos son independientes del pH, y se deben mayormente del tipo de alimento ingerido.

### **2.1.2. Patogenia**

La aparición de acidosis en un animal puede ser de forma aguda o crónica (también llamada subclínica, subaguda, o SARA, del inglés "subacute ruminal aidosis"). A nivel de diagnóstico, la acidosis aguda presenta signos específicos como anorexia, diarrea y deshidratación (Owens y col., 1998), aunque en condiciones de campo este tipo de acidosis suele presentarse de forma accidental, y es muy difícil hacer un diagnóstico precoz. Por otro lado, los síntomas de la acidosis subclínica son poco evidentes, y a menudo se asocian a otro tipo de problemas, como al aporte forrajes de baja calidad o a deficiencias en el manejo alimentario de la explotación. De esta manera, la acidosis subclínica puede provocar enormes pérdidas económicas, reduciendo la eficiencia productiva de las explotaciones.

La principal manifestación clínica de la acidosis ruminal subclínica es la inconsistencia en la ingesta de alimento, lo que puede comportar una reducción de la eficiencia por valor de 15 a 20 € por animal (Schwartzkopf-Genswein y col., 2003). No obstante, a menudo estas pérdidas no se detectan hasta el final del cebo, ya en el matadero, con bajos rendimientos en las canales o abscesos hepáticos. Otros síntomas durante el cebo pueden ser diarreas idiopáticas o episodios de laminitis (Kleen y col., 2003; Oetzel, 2003). Diferentes estudios han tratado de establecer arbitrariamente un valor de pH ruminal para diferenciar entre uno u otro tipo de acidosis. Sin embargo, hay otros factores más allá del pH ruminal que determinan la aparición del trastorno digestivo, como el tiempo transcurrido a cierto pH (Cerrato-Sanchez y col., 2008), o la susceptibilidad individual de cada animal (Plaizier y col., 2008).

### **2.1.3. Incidencia y repercusiones**

La acidosis ruminal, aguda o subclínica, es un problema que afecta tanto a explotaciones de vacuno de leche como de engorde. En España, los problemas digestivos, de entre los que destaca la acidosis en cebaderos, suponen un 30% de las muertes registradas (Hernández Bermúdez, 2002). Sin embargo, dada la dificultad de diagnosticar acidosis subclínica, existe poca información sobre su prevalencia en granjas. En otros países, como Estados Unidos, se estima que la incidencia de acidosis ruminal subclínica podría situarse entre el 20 y el 40% (Garret y col., 1997; Oetzel y col., 1999), lo que supondría un coste económico en vacas lecheras de entre 400 y 475 dólares anuales por animal (Stone, 1999). En granjas de vacuno lechero de Alemania, se estima que la prevalencia media es del 13,8%, pudiendo variar desde un 0 hasta un 38% (Kleen y col., 2009). En Australia, el coste anual en los cebaderos de terneros es superior a los 9 millones de dólares (Shu y col., 1999).

## **2.2. Timpanismo**

### **2.2.1. Etiología**

También conocido como meteorismo, se trata de una disfunción ruminal que cursa con la acumulación excesiva de gas dentro del rumen. Existen dos tipos de timpanismo dependiendo de su origen:

- 1) Timpanismo gaseoso: Cuando el proceso de eructación está inhibido y se acumula gas libre en el rumen.
- 2) Timpanismo espumoso: Cuando el líquido ruminal forma una espuma estable incapaz de ser eliminada por la eructación.

La formación de gases en el rumen, como dióxido de carbono o metano, es normal a ritmos de 0'2 a 2'0 L/min (Clarke y Reid, 1974). En condiciones normales, la mayoría de estos gases son eliminados del rumen mediante la eructación. El proceso de la eructación se inicia con la presencia

de gas libre en el saco dorsal del rumen, el cual es empujado al exterior por el esófago mediante una serie de contracciones musculares. En el caso del timpanismo gaseoso, sin embargo, ya sea porque los movimientos musculares están inhibidos, o porque existe una obstrucción a nivel de cardias o esófago, el gas no puede ser expulsado correctamente y se acumula en el rumen hasta llegar a mostrar síntomas clínicos.

En el caso del timpanismo espumoso, un aumento de la viscosidad del líquido ruminal hace que el gas formado no alcance el saco dorsal, quedando atrapado en forma de espuma estable e impidiendo su salida del rumen mediante la eructación. En animales que incorporan en su dieta pastos frescos, los componentes naturales de las plantas (como las saponinas) son los principales causantes de este aumento de viscosidad (Majak y col., 1995; Min y col., 2006). En el caso de animales en cebo intensivo, dietas ricas en hidratos de carbono de fácil fermentación aumentan la concentración de mucopolisacáridos de origen bacteriano (Clarke y Reid, 1974) y la liberación de macromoléculas de lisis celular (Cheng y col., 1976), aumentando la viscosidad y estabilización de la espuma. El timpanismo espumoso puede aparecer acompañando a la acidosis, ya que en el transcurso de dicha enfermedad se ven favorecidas bacterias liberadoras de mucopolisacáridos, como *S. bovis*, y la motilidad ruminal se ve reducida (Cheng y col., 1998).

### **2.2.2. Patogenia**

Ambos tipos de timpanismo provocan una distensión abdominal, inicialmente del flanco izquierdo, pero que en casos graves puede extenderse a ambos lados del abdomen. Sin embargo, mediante la palpación y la auscultación con succión de la pared abdominal pueden diferenciarse fácilmente. En el timpanismo gaseoso, la distensión es globosa a la palpación y al auscultar se percibe un sonido característico de aire acumulado (sonido timpánico o de "olla cascada"). El timpanismo espumoso, por otro lado, presenta una distensión dura a la palpación, y al auscultar se percibe un sonido mate.

Además de la distensión del rumen, el timpanismo muestra otros síntomas como el arqueamiento dorsal del animal, el pataleo abdominal, marcha tambaleante, vómitos, emisión frecuente de orina y heces, respiración con ollares dilatados, lengua extendida y colapso eventual, pudiendo llegar hasta la muerte del animal (Essig y col., 1988).

### **2.2.3. Incidencia y repercusiones**

Aunque su rápida aparición y su elevada tasa de mortalidad dan al timpanismo gaseoso más notoriedad, el 90% de los casos de timpanismo son de tipo espumoso (Howarth y col., 1991).

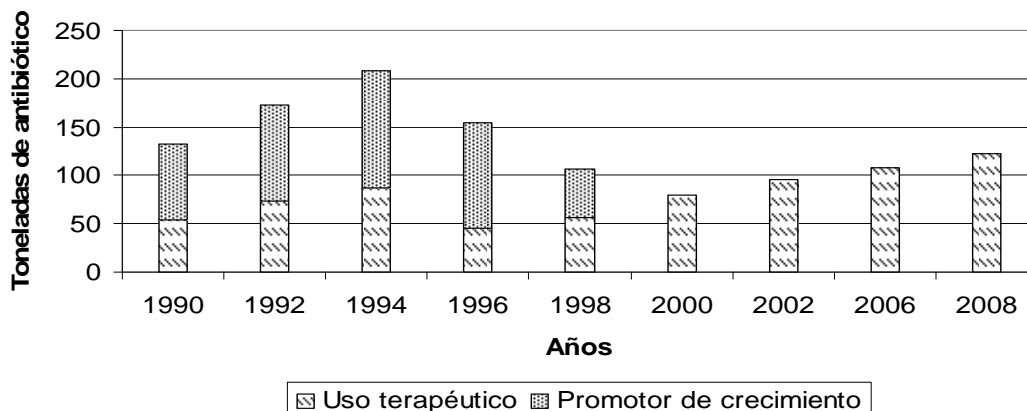
Existen pocos estudios sobre la incidencia de timpanismo a nivel nacional. En un análisis de las bajas correspondientes a más de 70.000 terneros en cebo entre los años 2001 y 2008, Devant (2008) estimó en 0,31% la frecuencia de muertes por timpanismo, lo supone casi un 8 % del total de bajas durante el cebo. De este estudio también se desprende que la raza, el sexo y el mes del año son factores que repercuten en el porcentaje de bajas por timpanismo, siendo los machos Frisones, y entre Diciembre y Enero, los más susceptibles. Estudios realizados en otros países como Estados Unidos y Canadá revelan datos sobre la mortalidad de ganado atribuida al timpanismo, y la sitúan entre un 0,1 y 0,2% (Merrill, 1994). Sin embargo, aunque la muerte es la mayor pérdida económica visible asociada con el timpanismo en el engorde intensivo, las pérdidas económicas asociadas a su tratamiento y al descenso de producción de los animales sobrevivientes son seguramente más importantes.

### 3. ALTERNATIVAS AL USO DE ANTIBIÓTICOS

#### 3.1. Antecedentes

A pesar de los conocimientos que se tiene sobre los diferentes trastornos digestivos, constantemente aparecen nuevas líneas de investigación que buscan optimizar la fermentación ruminal con diferentes medios y objetivos. En los últimos años, los esfuerzos de buena parte de la comunidad científica se han centrado en el estudio y desarrollo de aditivos naturales y seguros para el consumidor, capaces de sustituir a los antibióticos promotores de crecimiento. Hasta el 1 de Enero del 2006, el uso de estos antibióticos ionóforos en la producción de carne de bovino era muy extenso, debido a sus notables efectos positivos sobre la eficiencia productiva, así como en la reducción de la incidencia de patologías digestivas (Bergen y Bates, 1984). Sin embargo, el uso indiscriminado de algunos antibióticos a dosis subclínicas favorece la aparición de resistencias (Dutil y col., 2010), las cuales pueden transmitirse entre animales y llegar al humano. Si miramos la experiencia de Dinamarca, país que prohibió el uso de antibióticos 8 años antes que la UE, los resultados muestran como el porcentaje de cepas resistentes de *Escherichia coli* provenientes de carne de bovino se ha reducido en un 53,5% (DANMAP, 2010). El uso total de antibióticos en ganadería también se vio reducido considerablemente, aunque desde entonces, el uso con finalidad terapéutica ha aumentado (Figura 6).

**Figura 6.** Evolución del uso de productos antibióticos en Dinamarca

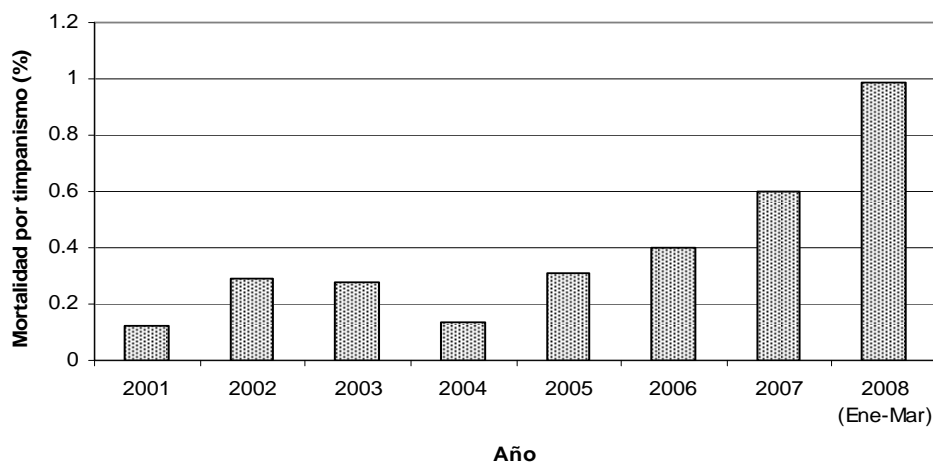




Los defensores del uso de los antibióticos atribuyen esta subida al aumento de la incidencia de patologías, mientras que los que defienden su prohibición argumentan que es una subida proporcional al aumento en el número de animales. Y es que en Dinamarca, dónde la cabaña porcina copa el 80% del total de animales, el número de cerdos ha aumentado más de un 20% desde el año 2000.

En España, la percepción general es que tras la prohibición del uso de ionóforos empiezan a aparecer en las explotaciones de cebo una serie de patologías emergentes como timpanismos, acidosis, coccidiosis o enterotoxemias. De hecho, Devant (2008) señala que en el año 2007, el primero desde la retirada de la monensina, la frecuencia de bajas por timpanismos se duplicó, para situarse, en los meses de Enero a Marzo de 2008, entorno al 1% (Figura 7).

**Figura 7.** Distribución por años de la mortalidad por timpanismo (adaptado de Devant, 2008).



### 3.2. Manejo de la alimentación

Tradicionalmente, los estudios sobre trastornos metabólicos y de rendimiento se han centrado en aspectos nutricionales y fisiológicos, obteniendo como resultado una gran cantidad de trabajos que evalúan la formulación de raciones, las técnicas de procesado de los alimentos y el manejo de la alimentación, con el objetivo de aumentar la ingesta y el

rendimiento sin aumentar la incidencia de trastornos digestivos. Es por esto que, tras la prohibición del uso de los antibióticos, el mayor porcentaje de bajas y la disminución de los índices de conversión han obligado a que el sector del vacuno de carne modifique las pautas de manejo de la alimentación, lo que incluye:

- Garantizar el acceso de los animales a paja de buena calidad y alta palatabilidad, para conseguir el efecto tamponante que se persigue con su consumo.
- Asegurar la disponibilidad de pienso manteniendo suficiente espacio de comedero por animal.
- Evitar altas densidades de animales, reduciendo así el estrés por la jerarquía y la competencia a la hora de comer.
- Control e higienización del agua empleada en el cebadero, para reducir la cantidad de *Clostridium spp.*, causantes de algunas de las muertes por enterotoxemias.

En cuanto a los aspectos nutricionales, ha habido un replanteamiento de la formulación con el objetivo de mantener una buena salud ruminal. Lo más destacado ha sido:

- En el caso de los almidones, buscar un equilibrio entre distintas velocidades de degradación, reduciendo la proporción de los rápidamente fermentables.
- Garantizar un mínimo de consumo de fibra efectiva para estimular la rumia y la producción de saliva por parte del ternero.
- Aumentar la proteína degradable en rumen para maximizar la asimilación de los azúcares por parte de la flora ruminal, impidiendo bajadas bruscas de pH o formaciones excesivas de metano.

Sin embargo, la razón por la cual algunos animales padecen trastornos digestivos mientras otros no, es aún desconocida. La diferencia entre unos y otros puede estar relacionada, en parte, con la estabilidad de sus poblaciones microbianas del rumen, pero también influyen sus

preferencias alimentarias, su capacidad de seleccionar en el comedero, o su ritmo de ingestión (Zinn, 1994; Voisinet y col., 1997; Grant y Albright, 2001; Schwartzkopf-Genswein y col., 2003; DeVries, 2010). Los patrones de ingesta difieren notablemente entre individuos de un mismo corral (Gibb y col., 1998; Hickman y col., 2002; Schwartzkopf-Genswein y col., 2002), pudiendo predisponer a la acidosis aquellos comportamientos que resulten en un mayor ritmo de ingesta o en mayores tamaños de comida (Allen, 1997; Nagaraja y Chengappa, 1998), mientras que conductas que mantengan una elevada frecuencia de comidas resultan en ingestas más uniformes, reduciendo el riesgo de padecer trastornos digestivos (Schwartzkopf-Genswein y col., 2003).

De este modo, el manejo de la alimentación en una granja debe actuar en armonía con la conducta de alimentación animal, permitiendo que se mantenga un pH ruminal estable, evitando grandes variaciones en la ingesta diaria (Elam, 1976; Pritchard y Bruns, 2003). Otros factores que se asocian con una mayor incidencia de acidosis en terneros de engorde son: reducido espacio en comedero, inapropiada mezcla de la ración (permitiendo que los animales seleccionen), tiempo de acceso al comedero limitado, alimentación restringida versus alimentar con un 5-10 % de rechazo, horario de alimentación variable, no acercar la comida frecuentemente, elevada competencia en el comedero, estrés por calor, ingredientes de calidad variable (silos particularmente), pobre ventilación, suelos resbaladizos, camas inadecuadas o con un pobre mantenimiento, o elevada densidad animal (Grant y Albright, 1995; Shaver, 2002). La combinación de dos o más de estos factores se da frecuentemente en granjas comerciales, aumentando la incidencia de trastornos digestivos.

### **3.3. Aditivos alimentarios**

Como hemos visto, la optimización de la fermentación ruminal debe centrarse en la formulación correcta de raciones y en un manejo adecuado de los programas de alimentación. Sin embargo, cuando estas estrategias ya están implementadas, es posible obtener beneficios adicionales mediante

el uso de aditivos que modulen la fermentación ruminal. El vacío dejado en el mercado tras la prohibición de los antibióticos promotores del crecimiento ha sido ocupado por aditivos de diferente naturaleza capaces de simular, en mayor o menor medida, los efectos de los antibióticos, como los tampones, levaduras, extractos de cultivos, extractos naturales de plantas o tratamientos con anticuerpos. Todos ellos tienen la capacidad de modular de una u otra forma la fermentación ruminal con la finalidad de mejorar la productividad y/o reducir la incidencia de desequilibrios digestivos en el animal.

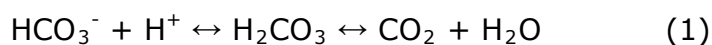
### 3.3.1. Tampones y alcalinizantes

Durante más de 40 años, el bicarbonato sódico ( $\text{NaHCO}_3$ , BS) se ha utilizado de forma rutinaria en raciones para rumiantes por su capacidad tamponante del líquido ruminal. Excelentes revisiones literarias han determinado la eficacia de BS aumentando la ingesta de MS (0.5-1.24 kg/d), el pH ruminal (0.07-0.13) y la ratio acético:propiónico (0.26-0.30) (Erdman, 1988; Staples y Lough, 1989; Hu y Murphy, 2004). Sin embargo, estos efectos se dan mayoritariamente bajo determinadas circunstancias, como con dietas con ensilado de maíz como forraje, dietas donde la proporción de concentrado es superior al 50%, o con inclusiones de BS por debajo del 2,4% de MS (recomendablemente entre 0,7 y 1,0% de MS, según Hu y Murphy, 2004; Sauvant y col., 2006).

En la revisión de Erdman (1988), se realiza un análisis de 11 estudios con vacuno lechero alimentado con raciones con menos del 30% de forraje, mostrando un aumento ( $P < 0,05$ ) del pH ruminal de 6,31 a 6,53 con la adición de BS. Sin embargo, cuando en los estudios analizados se utilizaban raciones con más del 30% de forraje, los efectos de BS dejaron de ser significativos. Además, se encontró una relación negativa entre la eficiencia del BS y el contenido en fibra ácido-detergente de la ración, concluyendo que el BS funcionaría mejor en dietas concentradas que en las forrajeras. Esto es confirmado por González (2005), en un análisis de 60 trabajos con BS en terneros de cebo y vacas de leche con raciones altas en

concentrados, en el que se observó un efecto de BS sobre el pH siempre significativo, y mayor conforme aumentaba el porcentaje de concentrado en la ración.

Existen diferentes teorías que explican los efectos de BS en el medio ruminal. La teoría tradicional explica los efectos de BS en el rumen por medio de su capacidad tamponante (Erdman, 1988). En base a esta teoría, Kohn y Dunlap (1998) explicaron que el BS actúa como captador de protones, neutralizando el pH ruminal, y desplazando el equilibrio del sistema (1) hacia el CO<sub>2</sub>.



El excedente de CO<sub>2</sub> generado se eliminaría mediante la eructación. Russell y Chow (1993), sin embargo, cuestionaron que aditivos carbonatados pudieran actuar como tampones ruminales, ya que el líquido ruminal ya es una solución saturada en CO<sub>2</sub>, y propusieron un modo de acción basado en la habilidad de las sales tampones de incrementar la ingesta de agua y, en consecuencia, la tasa de dilución del medio ruminal. Debido a que los carbohidratos fermentables están habitualmente en pequeñas partículas que tienden a fluir con la fase líquida, esto explicaría una fermentación menor de esta fracción, lo que haría disminuir la producción de propionato y aumentar el pH ruminal. Así, concluyen, los bicarbonatos beneficiarían más frecuentemente a los rumiantes alimentados con grandes cantidades de carbohidratos fácilmente fermentables, donde el ritmo de dilución es bajo *per se*, como en las típicas raciones para terneros en cebo.

Sin embargo, el aumento de la ingesta de agua no es consistente en la literatura (González y col., 2008), o bien se encuentra con cantidades de BS mayores a las usadas habitualmente (por ejemplo, al 5 % de MS; Rogers y Davis, 1982). Finalmente, existe otra teoría que basa los efectos del BS en los efectos del aporte de Na<sup>+</sup> y HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> por separado, sobre el metabolismo ácido-base sistémico. Block (1994) argumenta que la adición

de BS causa efectos sobre el rumen debido al aporte de  $\text{HCO}_3^-$ , tal y como explica la teoría tradicional, pero sugiere que el aporte de  $\text{Na}^+$  también implica un aumento en el diferencial catión-anión dietario (DCAD), definido como miliequivalentes de  $[\text{Na}^+ + \text{K}^+] - [\text{Cl}^- + \text{S}^-]$  por kilogramo de dieta en MS. Cambios en el DCAD tienen una participación indirecta sobre la función renal, el sistema tamponante, y el mantenimiento celular (Apper-Bossard y col., 2010), lo que podría explicar los diferentes efectos de BS, incluyendo el aumento de la ingesta de agua.

El sesquicarbonato de sodio ( $\text{NaHCO}_3 \cdot \text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ; SCS) también tiene potencial para neutralizar ácidos, lo que en vacuno lechero resulta en un aumento medio del 4% en la producción de leche corregida en grasa comparado con dietas control (Aguilar y Jordan, 1985; Cassida y col., 1986; Cassida y col., 1988; Ghorbani y col., 1989; Solorzano y col., 1989). No existe mucha información sobre el uso de SCS en terneros de engorde. Leventini y col. (1990) observaron una mejora de la fermentación ruminal en terneros de engorde alimentados con SCS, aunque esta mejora no se tradujo en un mejor rendimiento productivo. Los efectos específicos del SCS sobre la ingesta de MS y la producción y composición de la leche son diferentes dependiendo de la composición de la dieta (Clark y col., 2009), la etapa de lactación (Tucker y col., 1994), y la fuente de SCS (Staples y Lough, 1989).

También existen agentes alcalinizantes que pueden contribuir al control de la acidosis, siendo el óxido de magnesio ( $\text{MgO}$ ) el más usado. El  $\text{MgO}$  ha sido usado comúnmente en vacuno lechero con dietas ricas en concentrado para prevenir la caída en el contenido de grasa de la leche. Erdman (1988) mostró como el  $\text{MgO}$  aumentó la grasa en leche en el vacuno lechero, y que este efecto fue mayor a medida que el contenido en fibra de la dieta descendía. Le Ruyet y Tucker (1992) compararon los efectos de algunos tampones y el  $\text{MgO}$  sobre el pH ruminal, mostrando un aumento de éste tras la adición de  $\text{MgO}$ . Sin embargo, su efecto se desarrolla lentamente, y solo es relevante 24 horas después del tratamiento, probablemente debido a su baja solubilidad.

Los efectos del MgO sobre el pH en terneros de engorde son variables. Peirce y col. (1983) no obtuvieron ningún efecto a nivel de pH ruminal, mientras que Christiansen y col. (1990) si encontraron un aumento del pH en el tracto digestivo. Calsamiglia y col. (2010) analizaron 11 artículos donde MgO fue usado como único aditivo en raciones para vacuno lechero. En siete de ellos el MgO aumentó el contenido en grasa de la leche una media de  $0,44 \pm 0.06$  unidades porcentuales, pero sus efectos sobre el pH ruminal no fueron consistentes, aumentando en solo tres de los once artículos. Estos resultados parecen apoyar la hipótesis de que el MgO actúa a nivel del metabolismo sistémico, en lugar de en el rumen. De hecho, algunos autores (Emery y col., 1965; Huber y col., 1969; Thomas y Emery, 1969) sugieren que MgO afecta la glándula mamaria aumentando su captación de acetato y triglicéridos plasmáticos. El carbonato sódico también ha sido utilizado como agente alcalinizante, aunque existen pocos estudios donde se haya usado en dietas ricas en concentrado, y sus resultados son contradictorios (Emery y col., 1965; Belibasakis y Triantos, 1991).

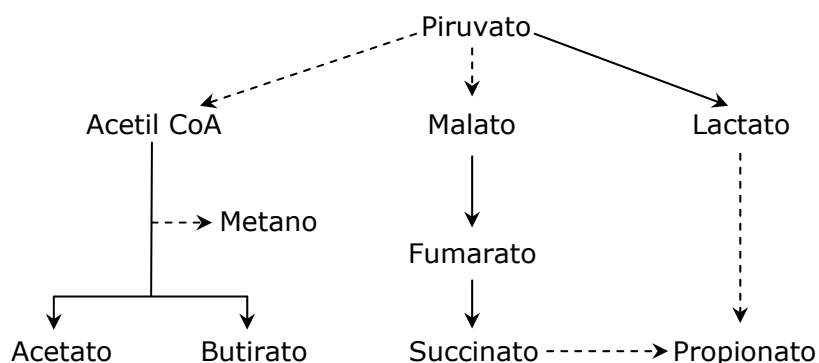
Debido a que alcalinizantes y tampones parecen actuar a diferentes niveles a la hora de tratar problemas de acidosis, parece razonable suponer un efecto aditivo o sinérgico al combinar, por ejemplo, BS y MgO. Erdman (1988) probó la interacción de ambos aditivos sobre la grasa en leche concluyendo que, en condiciones prácticas, sus efectos son aditivos y se pueden usar de forma combinada para tratar problemas de bajo pH ruminal. Sin embargo, hay pocos experimentos donde este efecto aditivo sea probado de forma directa (Erdman y col., 1980; 1982).

A pesar de estas evidencias, es obvio que desde la experiencia de campo los beneficios reales a la hora de controlar el pH ruminal con tampones y alcalinizantes son limitados, y no parecen ser capaces de controlar trastornos digestivos como la acidosis por sí solos. Esto es consistente con la hipótesis que parte de los efectos observados son pH-independientes, y deben ser resueltos usando otras estrategias nutricionales alternativas.

### 3.3.2. Ácidos orgánicos

Los ácidos orgánicos se encuentran de forma natural en los animales, bien en los tejidos como productos intermedios de ciclos metabólicos, o como resultado de procesos de fermentación en el tracto digestivo. En los rumiantes, los hidratos de carbono de la ración se degradan en el rumen hasta convertirse en piruvato, el cual es metabolizado por los microorganismos ruminales hasta producir ácidos grasos volátiles (principalmente acético, propiónico y butírico). El ácido málico y el fumárico son metabolitos intermediarios de la llamada "vía succínica" del piruvato, la cual termina con la producción de propiónico, pero a diferencia de otras vías metabólicas, sin producir metano, ni láctico (Figura 8).

**Figura 8.** Esquema del metabolismo del piruvato y la formación de los principales ácidos grasos en rumen.



El uso de ácidos orgánicos (o sus sales) como aditivos alimentarios está más extendido en animales monogástricos, aunque en rumiantes también se ha demostrado que sustancias como el malato, fumarato, o aspartato son capaces de duplicar la población de bacterias como *Selenomonas ruminantium* (Nisbet y Martin, 1991), principal utilizadora de láctico, así como aumentar hasta 10 veces la eficiencia de captación de dicho ácido (Nisbet y Martin, 1990; Carro y Ranilla, 2003). Sin embargo, el estudio de los efectos de los ácidos orgánicos sobre la fermentación ruminal, así como su modo de acción, ha sido mayoritariamente *in vitro*, por



lo que existe poca información sobre sus efectos sobre los procesos digestivos de rumiantes.

En el caso de terneras alimentadas con un alto porcentaje de concentrado en la ración, la adición de malato o ácido málico ha resultado en un aumento linear del pH ruminal (Martin y col., 1999), o en caídas post-prandiales del pH menos acusadas (Montano y col., 1999). Sin embargo, estos efectos no son consistentes en la bibliografía (Foley y col., 2007), y factores como la relación forraje:concentrado de la ración o el tipo de forraje pueden influir en la respuesta a la suplementación del ácido orgánico (Castillo y col., 2004). Además, la reducción de la concentración de lactato no explicaría completamente el aumento del pH ruminal, sugiriendo que los ácidos orgánicos también podrían tamponar el medio ruminal mediante la producción de CO<sub>2</sub> (Callaway y Martin, 1996; Martin, 1998). Este aumento de pH permitiría aumentar el crecimiento de bacterias fibrolíticas, más sensibles a bajos pH, y estabilizar el ambiente ruminal (Newbold y col., 1996).

### **3.3.3. Extractos de plantas**

Los extractos de plantas son productos ricos en metabolitos secundarios de plantas que tienen la capacidad de modificar la actividad microbiana. Algunos de los metabolitos secundarios que incluyen los extractos de plantas son taninos, saponinas y aceites esenciales (principalmente terpenoides y fenilpropanoides). Sin embargo, la diversidad en su naturaleza y actividades hace que el mundo de los extractos de plantas sea extremadamente complejo.

#### **3.3.3.1. Taninos**

Los taninos, o proantocianidinas, son un grupo diverso de flavonoides poliméricos cuya estructura se une fácilmente con proteínas. Esta reacción tanino-proteína ha sido estudiada para aumentar la proteína by-pass del rumen, con el objetivo de mejorar el metabolismo proteico (Aerts y col.,

1999), y para reducir las emisiones de metano en rumiantes (Woodward y col., 2002; Pinares Patiño y col., 2003; Puchala y col., 2005).

A nivel de metabolismo proteico, los taninos condensados actúan reduciendo la degradación en el rumen de proteína a amoníaco, aumentando el flujo de proteína al resto del tracto digestivo. El bajo pH del abomaso causa la disociación del complejo tanino-proteína, dejando a la proteína disponible para ser digerida en intestino delgado (Waghorn y col., 1987). Por otro lado, Tavendale y col. (2005) propone dos mecanismos de acción para explicar el efecto de la adición de taninos sobre la producción de metano: 1) indirectamente mediante la reducción de la digestión de la fibra, reduciendo la producción de H<sub>2</sub>, y 2) directamente mediante la inhibición del crecimiento de bacterias metanogénicas.

Sin embargo, los efectos de los taninos sobre la fermentación ruminal van a variar ampliamente dependiendo de qué planta se ha extraído (McAllister y col., 2005), su dosis y su composición (Hervas y col., 2003). Así pues, podemos encontrar estudios en los que la adición de taninos reduce (Carulla y col., 2005) o no tiene efecto (Beauchemin y col., 2007) sobre la producción de metano, o estudios en los que se mejora (Mapiye y col., 2009) o no hay efecto (Krueger y col., 2010) sobre el rendimiento de crecimiento animal.

### **3.3.3.2. Saponinas**

Las saponinas son componentes esteroideos glicosilados, triterpenoides y esteroideos alcaloides que se encuentran en una gran variedad de plantas. El principal efecto que se le atribuye a las saponinas es su actividad antiprotozoaria (Francis y col., 2002; Wallace y col., 2002). Este efecto se explica por la capacidad de las saponinas de unirse al colesterol presente en las membranas celulares de los protozoos (Williams y Coleman, 1988; Wallace y col., 2002), causando la ruptura de dicha membrana (Francis y col., 2002).

Dado que los protozoos ingieren bacterias (Coleman, 1988), una reducción en la población de protozoos facilita el aumento del número de bacterias (Williams y Coleman, 1988), reduciendo la concentración de nitrógeno amoniacal proveniente de la lisis bacteriana (Cheeke, 2000). Este cambio en la microflora ruminal se acompaña de un cambio en el perfil de AGV, aumentando la proporción de propionato (Hristov y col., 1999). Sin embargo, existe una elevada variabilidad en los efectos de las saponinas en la literatura (Wina y col., 2005), y aún no se han determinado claramente las condiciones bajo las cuales su adición es beneficiosa.

### **3.3.3.3. Aceites esenciales**

Los aceites esenciales son metabolitos secundarios aromáticos y volátiles, extraídos mediante destilación de diferentes partes de múltiples plantas. Su composición química no solo varía según la planta de la que provenga (Dorman y Deans, 2000), también depende de la parte de la planta de dónde se extraiga, su grado de madurez y el ambiente en el que ésta crezca (Cosentino y col., 1999). De este modo, los aceites esenciales pueden contener diferentes mezclas de terpenos, principalmente monoterpenos (C10) y sesquiterpenos (C15), y una gran variedad de moléculas de bajo peso molecular, como hidrocarburos alifáticos, ácidos, alcoholes o aldehidos (Benchaar y col., 2008).

La capacidad antimicrobiana de los aceites esenciales ha sido demostrada frente a una gran variedad de microorganismos, incluyendo bacterias Gram-positivas y Gram-negativas (Dorman y Deans, 2000; Burt, 2004). Existen diferentes teorías que explican su mecanismo de acción. Acamovic y Brooker (2005) sugirieron que los metabolitos secundarios de las plantas interactúan con una gran variedad de componentes de la célula, capaces de modular dianas celulares e interactuando con procesos asociados a la membrana celular de las bacterias, incluyendo el transporte de electrones, el gradiente iónico, la translocación de proteínas, y otras reacciones enzima-dependientes (Ultee y col., 1999; Dorman y Deans, 2000). La naturaleza hidrofóbica y lipofílica de los aceites esenciales

favorece su afinidad por membranas celulares, y explicaría la mayor susceptibilidad de las bacterias Gram-positivas (Burt, 2004), ya que las Gram-negativas poseen una capa adicional que limita el contacto con componentes hidrofóbicos (Benchaar y col., 2008). Sin embargo, otros estudios (Helander y col., 1998; Trombetta y col., 2005) han demostrado que determinados componentes también son activos contra bacterias Gram-negativas, y sugieren que su efecto antimicrobiano se debe a la ruptura de la membrana plasmática de la bacteria, provocando pérdidas intracelulares.

Es precisamente por sus efectos antimicrobianos que, en los últimos años, un gran número de estudios han examinado los aceites esenciales como posibles sustitutos de los antibióticos promotores del crecimiento. Sin embargo, estos estudios utilizan una gran variedad de aceites esenciales y principios activos, tanto in vivo como in vitro, con diferentes dosis y raciones, por lo que no es de extrañar que sus resultados sobre la fermentación ruminal no sean uniformes (Calsamiglia y col., 2007; Benchaar y col., 2008). Así, por ejemplo, podemos encontrar que la adición de timol –monoterpeno que se puede extraer del tomillo (*Thymus spp.*) y del orégano (*Origanum spp.*)– aumenta la relación acético:propiónico cuando la ración es 60:40 de heno de alfalfa y pienso, con un pH ruminal de 6,4 (Castillejos y col., 2006), pero la disminuye cuando el líquido ruminal proviene de terneros alimentados con una ración 10:90 de paja y concentrado, con un pH de 5,5 (Cardozo y col., 2005).

Benchaar y col. (2008) cita estudios donde el ajo, anís, canela, capsicum, clavo, eneldo, y sus componentes activos reducen la desaminación considerablemente. Ésto se atribuye a un efecto inhibitorio sobre bacterias hiperproductoras de amoníaco, como *Clostridium sticklandii* o *Peptostreptococcus anaerobius*. Sin embargo, las elevadas dosis a las que la desaminación se ve inhibida, también implican un descenso en la producción de AGV, lo que demuestra que hay un descenso generalizado de la fermentación de la dieta. Por otro lado, algunos estudios (Castillejos y col., 2007; Benchaar y col., 2007) muestran como la desaminación no se vio afectada con la adición de aceites esenciales, mientras que otros

muestran como la adición de aceites esenciales aumenta la producción de AGV (Castillejos y col., 2005; Benchaar y col., 2007), o bien no muestran ningún efecto (Newbold y col., 2004; Beauchemin y Mcginn, 2006).

Existen pocos estudios de los efectos de los aceites esenciales sobre el rendimiento productivo de terneros de engorde. Benchaar y col. (2006) evaluaron el crecimiento de terneros alimentados con un silo suplementado con una mezcla de aceites esenciales, y vieron como la eficiencia de conversión aumentaba, aunque sin observar efectos sobre la ingesta de MS o la GMD. Otros (Meyer y col., 2009), en cambio, no observaron ningún efecto.

#### **3.3.4. Anticuerpos**

Una de las estrategias más recientes para prevenir la aparición de trastornos digestivos tras la prohibición de los antibióticos, se basa en el uso de anticuerpos específicos frente a grupos bacterianos ruminales, como *Streptococcus bovis*, *Lactobacillus spp.* o *Fusobacterium necrophorum*, involucrados en el proceso de la acidosis ruminal. Con este fin existen dos tipos de inmunización: activa y pasiva.

La inmunización activa consiste en vacunar a los animales con antígenos de estas bacterias. El animal genera inmunoglobulinas que son secretados a través de la saliva y llegan al rumen, donde frenan el desarrollo de estos microorganismos (Shu y col., 1999). Este método se ha mostrado eficaz reduciendo la concentración de ácido láctico y las poblaciones de *Streptococcus bovis* y *Lactobacillus spp.* en rumiantes alimentados con raciones ricas en concentrado (Gill y col., 2000; Shu y col., 2000).

La inmunización pasiva consiste en administrar directamente a los animales anticuerpos policlonales contra bacterias relacionadas con la acidosis. Mediante esta técnica, diferentes estudios (DiLorenzo y col., 2006; Blanch y col., 2009) han observado una disminución del número de dichas

bacterias similar a la observada usando antibióticos ionóforos (Coe y col., 1999), un aumento del pH ruminal medio diario, disminuciones en la incidencia de abscesos hepáticos y una mejora en el índice de conversión cuando los preparados contra estas bacterias fueron suplementados en raciones de terneros altas en concentrados.

Aunque no existe una extensa literatura sobre el uso de vacunas o anticuerpos para prevenir la aparición de trastornos digestivos, los primeros resultados indican que es una estrategia efectiva capaz de influir en grupos bacterianos específicos y modificar la fermentación ruminal.

### **3.3.5. Aditivos microbianos**

El objetivo de administrar aditivos microbianos es emular los efectos conseguidos por los antibióticos ionóforos, estableciendo una microflora intestinal favorable que prevenga desequilibrios que originen trastornos digestivos. Aunque no se ha establecido un mecanismo de acción claro para este tipo de aditivos, existen diferentes hipótesis, basadas en la modificación de las poblaciones microbianas del rumen, alteración de los patrones de fermentación ruminal, aumento de la digestibilidad de la dieta, o modulación del sistema inmunitario (Yoon y Stern, 1995; Krehbiel y col., 2003). En terneros de engorde, uno de los objetivos con mayor interés es el de controlar la acumulación de láctico en el rumen.

#### **3.3.5.1. Aditivos a base de bacterias**

Una vía para estimular el consumo de ácido láctico en el rumen es suplementar las raciones directamente con bacterias utilizadoras de láctico, como *Megasphaera elsdenii* o *Selenomonas ruminatum*. Estudios previos (Kung y Hession, 1995; Wiryawan y Brooker, 1995; Henning y col., 2010a; Henning y col., 2010b) han demostrado la eficacia de estos aditivos manteniendo una menor concentración de láctico, y un mayor pH ruminal, ante aumentos bruscos en el aporte de concentrado en la ración. Esta

estrategia, por tanto, puede ser usada en situaciones concretas en las que sepamos que existe riesgo de sufrir acidosis.

Otra forma de estimular las bacterias utilizadoras de láctico es, y aunque parezca contradictorio, aportando su sustrato principal: ácido láctico. Ciertas combinaciones de bacterias productoras de láctico, añadidas en la dieta, permitirían mantener un nivel basal constante de ácido láctico en el rumen. Esto estimularía a las bacterias utilizadoras de láctico, lo que haría reducir la carga total de ácido láctico y el pH en el rumen. Nocek y col. (2002) suplementaron una dieta de vacuno lechero con una mezcla de *Enterococcus faecium* y *Lactobacillus plantarum*, y observaron un pH mínimo más elevado y una menor área bajo la curva por debajo de pH 5,5 comparado con los animales control. Sin embargo, otros estudios que defienden esta teoría utilizan bacterias en combinación con levaduras, por lo que los efectos son confundidos (Ghorbani y col., 2002; Nocek y col., 2002; Nocek y Kautz, 2006).

También se han empleado otro tipo de bacterias con el objetivo de optimizar la fermentación de la dieta, como *Lactobacillus acidophilus* y *Propionibacteria freudenreichii* (Raeth-Knight y col., 2007), o *Propionibacterium* y *Enterococcus faecium* (Yang y col., 2004), pero sin obtener resultados favorables. Klieve y col. (2003) analizaron la inclusión de *Butyrivibrio fibrisolvens* como consumidor de almidón alternativo a *Streptococcus bovis*, principal productor de láctico. Sin embargo, la cepa utilizada no logró establecerse en el rumen, por lo que no se observaron efectos beneficiosos. Horn y col. (2009) apuntan que, en la práctica, el éxito de estas estrategias es variable, debido a que las cepas utilizadas no muestran elevados índices de crecimiento, y no pueden mantener su multiplicación a bajos pH ruminales.

#### **3.3.5.2. Aditivos a base de levaduras**

Son los aditivos microbianos más utilizados en alimentación animal, tanto en monogástricos como en rumiantes. Se engloban dentro de este

apartado los aditivos basados en levaduras viables, extractos de su cultivo, o combinaciones de los anteriores. Existen, de forma genérica, tres tipos principales de aditivos a base de levaduras para rumiantes:

- Extractos de hongos (EH): A base de *Aspergillus oryzae*, no garantizan la supervivencia de unidades formadoras de colonia (UFC). Contienen el hongo, su medio de cultivo y los productos de su fermentación.
- Levaduras vivas (LV): Garantizan la viabilidad de un número determinado de UFC de una cepa de *Saccharomyces cerevisiae*.
- Cultivos de levaduras (CL): No garantizan la supervivencia de UFC de *Saccharomyces cerevisiae*. Contienen la levadura, su medio de cultivo y los productos de su fermentación.

El principal efecto que se le atribuye a los EH es el aumento de la actividad microbiana ruminal (Frumholtz y col., 1989), tanto en terneros de engorde (Beharka y col., 1991) como en vacas lecheras (Wiedmeier y col., 1987), evidenciado por un aumento tanto de la concentración de AGV, como del número de bacterias ruminales, especialmente aquellas relacionadas con la digestión de la fibra (Beharka y Nagaraja, 1998). Yoon y Stern (1995) resumieron 14 estudios en los que se suplementó la dieta con *A. oryzae* y sugirieron que el aumento en la digestión de la fibra reducía el llenado ruminal, resultando en un aumento en la ingestión de alimentos y, en consecuencia, de la producción. Además, también se ha encontrado que la adición de EH aumenta el uso de lactato por *Selenomonas ruminantium* (Nisbet y Martin, 1990) y *Megasphaera elsdenii* (Waldrip y Martin, 1993).

Si bien los efectos de los EH están bien definidos, no existe tal consenso a la hora de definir los efectos de la adición de productos a base de levaduras. Existe un gran número de publicaciones que muestran una gran variedad de efectos de las levaduras sobre la fermentación ruminal. La comparación de los resultados es compleja, debido a la gran variedad de productos y cepas de *S. cerevisiae* utilizadas, estudiadas con diferentes especies, dietas y sistemas de producción. Diferentes revisiones



bibliográficas han tratado de aportar una visión general sobre la influencia de la adición de levaduras en la digestión ruminal y la productividad animal. Desnoyers y col. (2009) realizaron un meta-análisis de 157 experimentos in vivo, mostrando cómo la adición de levaduras causa un aumento del pH ruminal, de la concentración de AGV, y de la digestibilidad de la MO; mientras que tiende a reducir la concentración ruminal de ácido láctico. Estos resultados coinciden con los de Robinson (2002), en cuya revisión de 14 experimentos con levaduras también mostró un aumento del pH ruminal, de la concentración de AGV, y un descenso de la concentración de láctico. Sin embargo, Lescoat y col. (2000), en su revisión de 40 experimentos, no encontraron ningún efecto de la adición de levaduras sobre el pH ruminal o la digestibilidad de la MO, aunque si observaron un aumento de la concentración de AGV. Finalmente, Sauvant y col. (2004), en su revisión de 78 experimentos, no observaron ningún efecto de la adición de levaduras sobre el pH ruminal o la concentración de AGV, y sólo mostraron una tendencia a aumentar la digestibilidad de la MO.

Así pues, el uso de levaduras puede derivar en una gran variedad de resultados de los que se desprenden conclusiones diferentes y a veces contradictorias, ya no solo entre experimentos, sino también entre las revisiones bibliográficas existentes, dependiendo del método estadístico utilizado o de los artículos científicos revisados. Algunos autores han tratado de identificar los principales elementos de variación que afectan, positiva o negativamente, a la respuesta del tratamiento con levaduras. Desnoyers y col. (2009) demostraron que el efecto positivo de las levaduras sobre el pH ruminal aumentaba con el porcentaje de concentrado de la dieta y con el nivel de ingesta de MS, pero estaba correlacionado negativamente con el contenido de FND de la dieta. Así mismo, el efecto positivo de las levaduras sobre la concentración de AGV aumentaba con la ingesta de MS y el nivel de PB de la dieta; mientras que el efecto positivo de las levaduras sobre la digestibilidad de la MO aumentaba con el porcentaje de concentrado de la ración y su contenido de FND. Por otro lado, Robinson y Erasmus (2009) revisaron 22 estudios con levaduras en vacuno lechero, mostrando que un mayor contenido de FND y FAD de la dieta reducía la respuesta productiva a

la adición de levaduras, mientras que otros factores como el contenido de almidón de la dieta no eran relevantes.

Además de los factores de variación relacionados con la composición de la dieta entre distintos experimentos, también existe la variación del producto a base de levadura utilizado. En el siguiente capítulo trataremos caracterizar los efectos según si el aditivo se basa en el uso de levaduras vivas o en los productos de su cultivo.

## **4. ADITIVOS A BASE DE LEVADURAS**

### **4.1. Antecedentes**

Actualmente podemos encontrar en el mercado una gran abanico de aditivos modificadores de la fermentación ruminal, todos ellos cargados de argumentos técnicos que demuestran la gran variedad de mecanismos de acción disponibles. Sin embargo, de entre todos ellos las levaduras cuentan con una mayor aceptación y cuota de mercado.

Las levaduras se utilizan en la alimentación animal desde hace décadas con el objetivo inicial de rentabilizar los subproductos de la industria cervecera. Más recientemente, sin embargo, se han introducido en el mercado una serie de productos a base de levaduras, utilizando diefrentes cepas de *Saccharomyces cerevisae*, que tratan de aportar un valor añadido. Estos productos se pueden dividir en 6 grupos según su naturaleza: levaduras vivas, levaduras muertas, pared celular, contenido celular, levadura entera hidrolizada o su medio de cultivo enriquecido. A todos ellos se les atribuyen diferentes mecanismos de acción, más allá de su valor nutricional, mediante los cuales estabilizan la flora ruminal, ayudando así a prevenir desórdenes digestivos. En los últimos años ha aumentado el interés por tratar de esclarecer su mecanismo de acción, así como su posible implicación en la fermentación ruminal de cara a optimizar la productividad bajo condiciones de producción intensivas. El interés en su uso continúa creciendo, acaparando gran parte del vacío dejado por los antibióticos tras su prohibición en la Unión Europea (1831/2003).

Existen diferentes empresas que producen este tipo de productos, comercializados con una gran variedad de nombres. Sin embargo, en el sector de los animales rumiantes existen principalmente dos tipos de aditivos a base de levaduras que compiten entre ellos directamente: productos con levaduras vivas y cultivos de levaduras.

#### 4.2. **Productos con levaduras vivas**

Los productos a base de levaduras vivas proporcionan al animal un número de células viables que se vuelven metabólicamente activas en el rumen, proporcionando beneficios nutricionales a la microflora ruminal. Este tipo de producto puede ser puro o mezclado con un diluyente, y garantiza entre 5.000 y 20.000 millones de unidades formadoras de colonia (UFC) por gramo.

Existen un gran número de artículos y revisiones relacionadas con los efectos de la inclusión de levaduras vivas en la alimentación de rumiantes, y se han descrito varios mecanismos de acción (Wallace, 1994; Fonty y Chaucheyras-Durand, 2006). Una de las hipótesis más antiguas argumenta que las levaduras son capaces de crecer en el rumen, al menos por un periodo breve de tiempo, proporcionando nutrientes que estimulan selectivamente a las bacterias celulolíticas ruminales, aumentando así la digestibilidad de la fibra y la ingestión de MS. Otro mecanismo de acción propuesto es que las levaduras estimulan el uso de ciertos productos de la fermentación ruminal, como el ácido láctico, que si se acumularan excesivamente en el rumen reducirían el crecimiento bacteriano, el pH y/o la ingesta. Otro mecanismo de acción argumenta que las levaduras vivas, al ser anaerobias facultativas, tienen la capacidad de captar las trazas de oxígeno que entran en el rumen durante la rutina diaria de alimentación, fortaleciendo así el estado anaeróbico del medio ruminal y estimulando la actividad de las poblaciones bacterianas anaerobias estrictas, como las bacterias celulolíticas (Newbold y col., 1996).

Para todos los mecanismos de acción propuestos se asume la supervivencia de las levaduras en el rumen, lo cual es puesto en duda por diferentes autores (Hession y col., 1992; Stone, 2002). La teoría en la que se basa la adición de este tipo de productos dice que las células de levaduras se rehidratan al entrar en el rumen y se convierten en metabólicamente activas. Sin embargo, el rumen es un entorno muy competitivo para que organismos anaerobios facultativos como las

levaduras funcionen correctamente. Además de carecer de oxígeno para el metabolismo respiratorio, el rumen se encuentra a una temperatura (39°C) por encima de la óptima para las levaduras (30°C), y con una elevada presión osmótica, resultado de la producción de metabolitos por parte de las bacterias ruminales. Este último factor puede afectar la captación de nutrientes y generar fugas intracelulares en las células de levaduras. En este sentido, Durand-Chaucheyras y col. (1998) demostraron que las levaduras no eran capaces de permanecer más de 30 horas en rúmenes de corderos gnotoxénicos, mientras que Kung y col. (1997), encontraron que las levaduras añadidas en un sistema de fermentación ruminal continuo in vitro no eran detectables pasadas 24 horas.

Además, las levaduras no pueden digerir componentes complejos de los alimentos como almidón o fibra, siendo sólo capaces de absorber azúcares simples. Existe una gran competencia por estos azúcares entre las diferentes poblaciones bacterianas, haciendo difícil la captación de alimentos. Como resultado, las enzimas de las grandes poblaciones microbianas pueden acabar atacando las paredes celulares de las levaduras y rompiendo las células. Es por todo esto que autores como Stone (2002), afirman que los beneficios de la adición de levaduras vivas provienen de la contribución nutritiva de su contenido celular cuando ésta se rompe, y no de substratos producidos directamente en el rumen.

#### **4.3. Productos con cultivo de levaduras**

Para obtener productos a base de cultivo de levaduras, las levaduras vivas han de fermentar en un medio controlado hasta obtener una concentración determinada de metabolitos. Estos metabolitos son los que darán al producto final la capacidad de actuar como estimulador de ciertos microorganismos ruminales. Tras la fermentación, se realiza el proceso de secado del producto. La viabilidad de las levaduras sólo es importante durante el proceso de fermentación anaeróbica llevado a cabo en la fábrica, ya que la cantidad de UFC presentes en el producto no es relevante ni afecta a su eficacia en la alimentación de los animales. En cuanto a los

metabolitos obtenidos, son muy estables y tienen una vida útil larga bajo condiciones normales de almacenamiento, soportando incluso los procesos comunes de procesamiento del alimento, como el peletizado.

El mecanismo de acción propuesto para los productos a base de cultivos de levaduras no se basa en los efectos de la levadura como organismo vivo. Son los fragmentos de su pared celular y los metabolitos producidos durante la fermentación los que proporcionan una mezcla de micronutrientes, como betaglucanos, nucleótidos, ácidos orgánicos, aminoácidos o vitaminas, capaces de estimular selectivamente el crecimiento de poblaciones bacterianas celulolíticas y así aumentar la fermentación de la fibra y la utilización de subproductos de la fermentación ruminal, como el ácido láctico (Callaway y Martin, 1997). Sin embargo, el mecanismo mediante el cual esto repercute en una mejora productiva del animal y/o en una optimización de la fermentación ruminal, no ha sido definido claramente.

#### **4.4. Efectos sobre la fermentación ruminal**

Como hemos mencionado anteriormente, algunos productos garantizan un número de UFC viables, mientras que otros sugieren que son los metabolitos presentes en el extracto de cultivo los componentes activos. Sin embargo, a pesar de que existe una gran cantidad de información disponible sobre ambos productos, a menudo se mezclan y confunden sus efectos y mecanismos de acción, existiendo poca información que clarifique las diferencias entre uno y otro grupo. De hecho, existen muy pocos estudios en los que se comparen los efectos de ambos tipos de productos bajo las mismas condiciones. El de Lynch y Martin (2002) es uno de ellos, y no muestra grandes diferencias en sus efectos sobre la fermentación ruminal. Robinson y Erasmus (2009) revisaron 22 artículos científicos en los que se utilizaron diferentes aditivos comerciales a base de levaduras en vacuno lechero, pero tampoco encontraron diferencias significativas en sus efectos.

Con el objetivo de analizar de una forma más detallada la bibliografía existente, para la elaboración de este capítulo se han recopilado un total de 46 publicaciones, 25 que trabajaban con levaduras vivas, y 21 que lo hicieron con cultivos de levaduras. En el Anexo 1 se puede consultar la lista completa de publicaciones incluidas. En esta recopilación únicamente se incluyen los estudios realizados in vivo, descartando los experimentos que analizan los efectos de las levaduras in vitro. En la mayoría de estos estudios se utilizaron vacas lecheras, aunque también terneras de engorde, ovejas, corderos e incluso cruces de zebú (Tabla 1).

**Tabla 1.** Distribución del tipo de estudio con levaduras por tratamiento.

<b>Animal</b>	<b>Tratamiento<sup>1</sup></b>	
	<b>LV</b>	<b>CL</b>
Vaca lechera	14	15
Tenera	8	4
Oveja	2	
Cordero	1	1
Zebú		1
TOTAL	25	21

1: LV (levaduras vivas): Alltech (1026), Chr. Hansen Co. (Biomate Plus), Santel Sante Animal (Levucell); o CL (cultivo de levaduras) : Diamond V Mills Inc. (YC, XP).

Las empresas que han financiado estos estudios han sido principalmente Diamond V Mills Inc. y Alltech Inc. Todos estos estudios han sido publicados en revistas científicas de gran impacto en el sector: Journal of Dairy Science (50%), Animal Feed Science and Technology (33%), Journal of Animal Science (14%) y Livestock Production Science (2%).

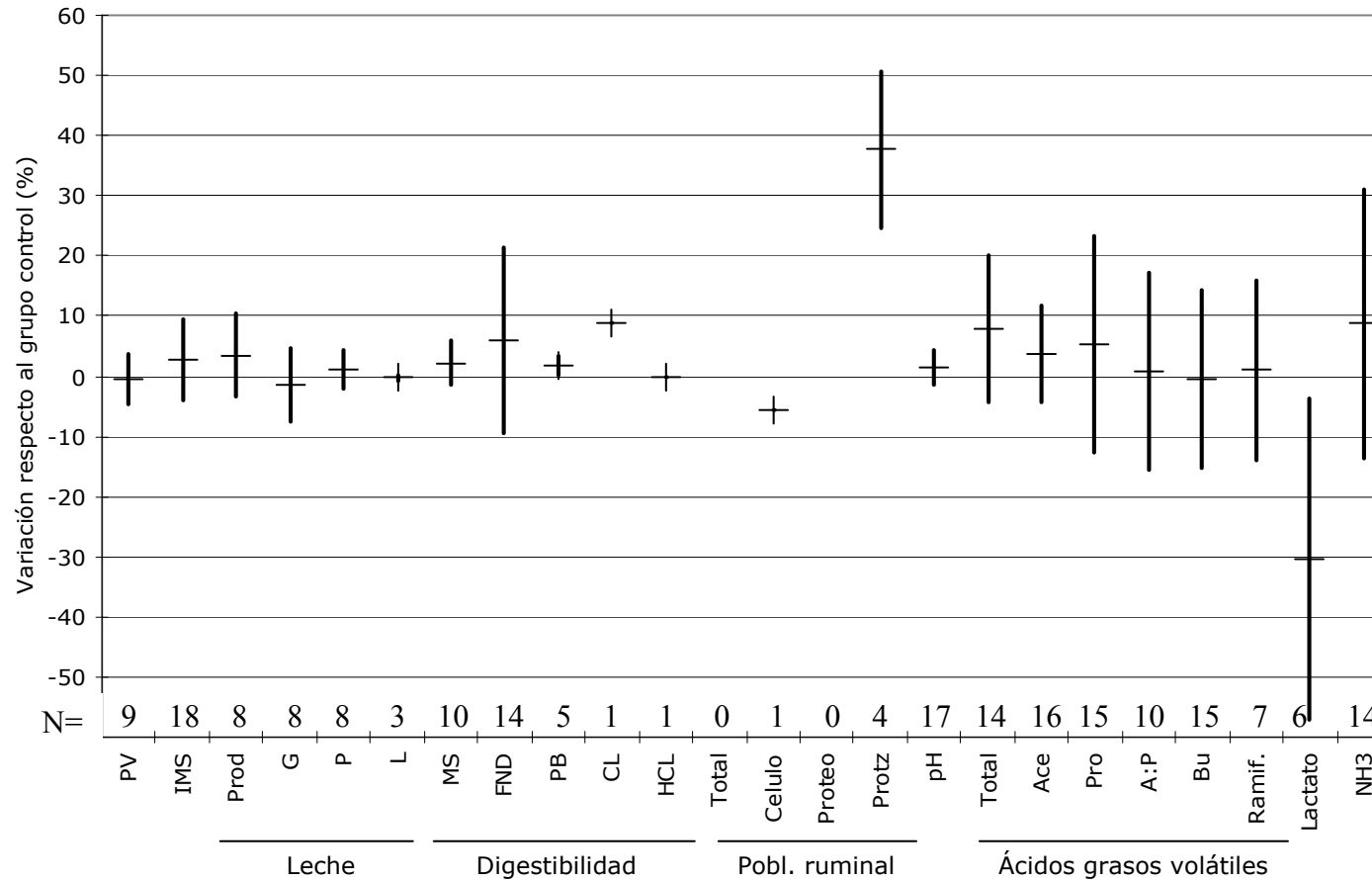
Las figuras 9 y 10 resumen de forma descriptiva los resultados hallados en los estudios analizados para los diferentes parámetros. En el

Anexo 1 también pueden consultarse los resultados individuales de cada estudio y la media global de cada parámetro.

Observando ambas figuras vemos que los efectos producidos por la adición de productos a base de levaduras son poco concluyentes para la mayoría de los parámetros. Esto es así por dos motivos: primero por la falta de efectos claramente significativos, situándose las medias de la mayoría de los efectos observados por debajo del 5%; y segundo, por su elevada variabilidad, ya que para la mayoría de los parámetros, la adición de levaduras tanto puede causar efectos positivos como negativos. No obstante, cabe decir que los resultados obtenidos pueden ser más importantes de lo que parece dependiendo del efecto biológico y el beneficio económico que implique. En cuanto a la elevada variabilidad, era de esperar ya que como hemos dicho anteriormente, en la lista de artículos revisados se incluyen trabajos con diferentes especies, aditivos comerciales y dietas. Es por esto que las medias obtenidas nos siguen siendo útiles para darnos una idea general sobre los efectos de cada producto, y orientarnos sobre los parámetros que se ven modificados.

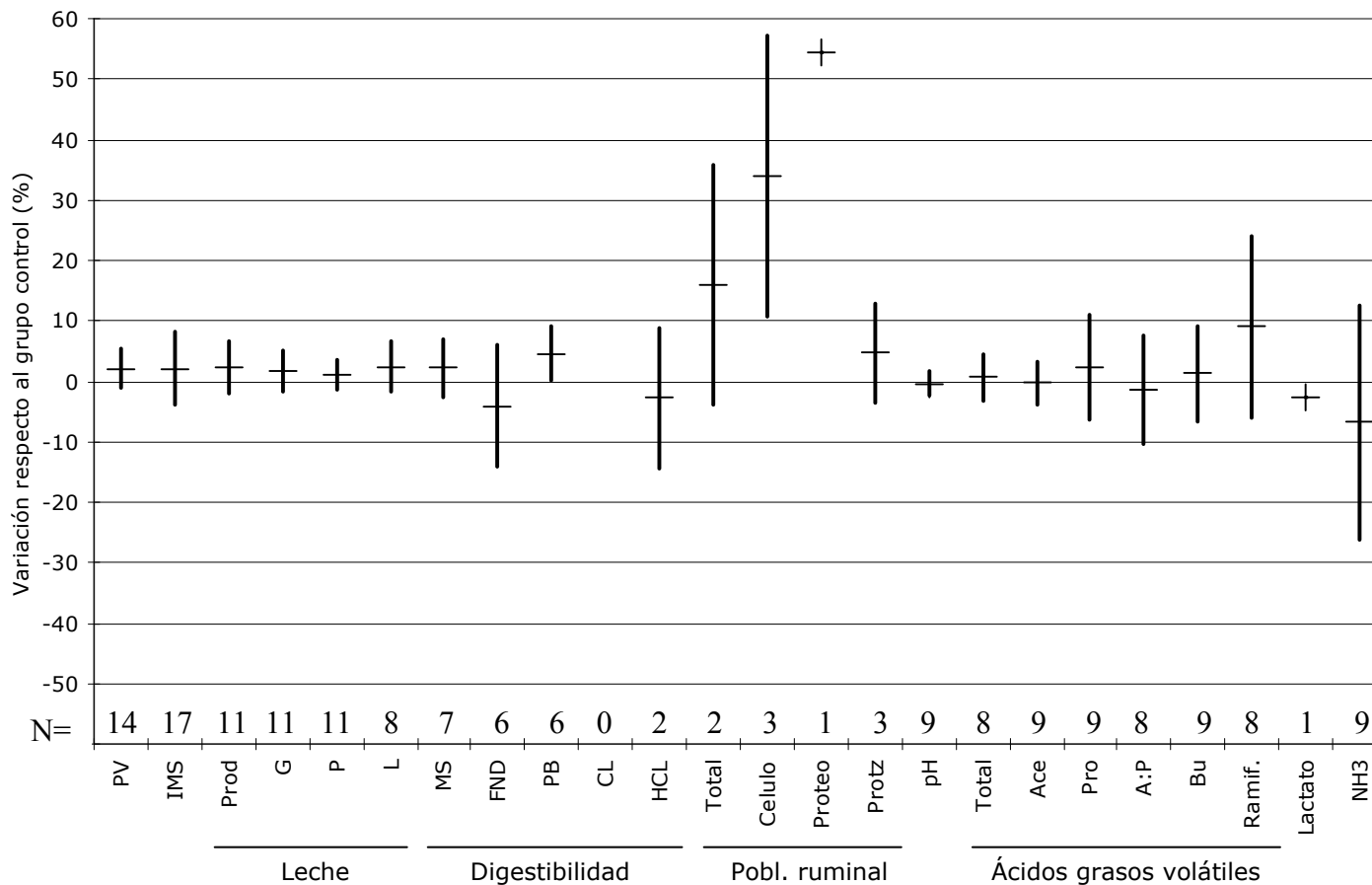


**Figura 9.** Media y desviación estándar de los resultados descritos en los estudios con productos a base de levaduras vivas. Resultados expresados como % de variación respecto al grupo control de cada experimento.



Parámetros determinados: PV=Peso vivo (Kg); IMS=Ingesta de materia seca (Kg/d); Prod=Producción de leche (Kg/d), G=% de grasa en leche, P=% de proteína en leche, L=% de lactosa en leche; Digestibilidad de MS=Materia seca, FND=Fibra neutro detergente, PB=Proteína bruta, CL=Celulosa y HCL=Hemicelulosa; Población ruminal: Total, Celulo=Bacterias celulolíticas, Proteo=Bacterias proteolíticas y Protz=Protozoos; pH=pH ruminal; Ácidos grasos volátiles: Total, Ace=Acético, Pro=Propiónico, A:P=Ratio acético/propiónico, Bu=Butírico y Ramif.=Ramificados; Lactato; NH3= Concentración de N amoniacal en rumen.

**Figura 10.** Media y desviación estándar de los resultados descritos en los estudios con productos a base de cultivo de levaduras. Resultados expresados como % de variación respecto al grupo control de cada experimento.



Parámetros determinados: PV=Peso vivo (Kg); IMS=Ingesta de materia seca (Kg/d); Prod=Producción de leche (Kg/d), G=% de grasa en leche, P=% de proteína en leche, L=% de lactosa en leche; Digestibilidad de MS=Materia seca, FND=Fibra neutro detergente, PB=Proteína bruta, CL=Celulosa y HCL=Hemicelulosa; Población ruminal: Total, Celulo=Bacterias celulolíticas, Proteo=Bacterias proteolíticas y Protz=Protozoos; pH=pH ruminal; Ácidos grasos volátiles: Total, Ace=Acético, Pro=Propiónico, A:P=Ratio acético/propiónico, Bu=Butírico y Ramif.=Ramificados; Lactato; NH3= Concentración de N amoniacal en rumen.

#### **4.4.1. Productos a base de levaduras vivas**

La adición de levaduras vivas en animales rumiantes causa un aumento medio de casi un 3% en la ingesta de materia seca. Este aumento en la ingestión se acompaña de un aumento de similar magnitud en la producción lechera (3,5%), pero no de un aumento del peso del animal, llegando incluso a reducirse levemente (0,4%). Además, la adición de levaduras vivas modifica el perfil de la leche producida, reduciendo el porcentaje de grasa (1,5%) y aumentando el de proteína (1,2%) en leche. El porcentaje de lactosa en leche apenas se ve afectado (0,3%). Siendo así, en una vaca lechera media que ingiera 22 Kg de MS y produzca 35 Kg de leche al día al 3,7% de grasa, la adición de levaduras vivas supondría aumentar su ingesta 0,6 Kg para producir 0,9 Kg de leche corregida al 4% de grasa a diario. Si tenemos en cuenta el precio aproximado de una ración completa para vacuno lechero (0,25 €/Kg), de la adición del producto con levaduras (0,07 €/animal y día) y el de la leche (0,30 €/kg), en el ejemplo de nuestra vaca lechera media, el retorno económico obtenido sería de 1,16 € por cada euro invertido por animal y día.

Además de aumentar la ingesta de alimento, la adición de levaduras vivas ayuda a aumentar su digestibilidad entorno al 2,2%. También aumenta la digestibilidad de la FND, de la PB y de la celulosa, aunque en este último caso sólo existe un estudio en que se determine (Wohlt y col., 1991). Así como en los casos de la digestibilidad de la MS y de la PB la mayoría de los estudios (71 y 75% respectivamente) confirman esta tendencia, la variabilidad en la digestibilidad de la FND es mucho mayor, observando un rango de resultados que va desde una reducción del 17,7% (Arcos García y col., 2000) hasta un aumento del 40,5 (Marden y col., 2008). Esto nos sugiere que los efectos de las levaduras sobre la digestibilidad de la fibra no son generalizables, sino que son altamente dependientes de factores ajenos al aditivo, como pueden ser el tipo de fibra de la dieta o su nivel de inclusión. Siendo así, sería lógico pensar que la mejora de la digestibilidad de la fibra no es el mecanismo de acción principal de los productos a base de levaduras vivas.

Lo mismo sucede cuando miramos las poblaciones microbianas ruminales. La adición de levaduras vivas no sólo no aumenta la población de bacterias celulolíticas, sino que en el único estudio en el que se determina, se observa una reducción del 5,5% (Erasmus y col., 1992). De esta manera, tampoco observamos resultados que confirmen la hipótesis que las levaduras vivas beneficien la fermentación ruminal gracias al aumento de este tipo de bacterias. Sin embargo, sí se observa un claro aumento (38%) en la población de protozoos ruminales, siendo ésta probablemente una de las causas que originan los efectos obtenidos al añadir levaduras vivas en rumiantes.

En cuanto a los parámetros de fermentación del rumen, la adición de levaduras vivas eleva ligeramente el pH ruminal (1,5%) a pesar de aumentar de forma consistente (7,8%) la concentración total de AGV. Los efectos sobre las proporciones individuales de los diferentes AGV son muy variables, con un amplio rango de resultados. Es mucho más evidente el efecto de las levaduras sobre el ácido láctico, causando una reducción media de más de un 30%. Estos resultados avalan las propiedades atribuidas a las levaduras vivas sobre su capacidad de estabilizar fermentaciones de dietas ricas en carbohidratos no fibrosos con un elevado riesgo de generar acidosis, ya sea estimulando el consumo de ácido láctico, o bien reduciendo su producción. De esta forma, aunque en el caso de los rumiantes destinados a producción de carne la adición de levaduras vivas no implica un beneficio productivo directo, si se pueden beneficiar de una fermentación ruminal más estable.

Finalmente, la adición de levaduras vivas aumenta en casi un 9% la concentración de nitrógeno amoniacal en el rumen. Esto puede estar relacionado con el aumento de la degradabilidad de la proteína previamente comentado.

#### **4.4.2. Productos a base de cultivo de levaduras**

La adición de productos a base de cultivos de levaduras causa un aumento medio del 2,1% en la ingesta de MS. Esto se traduce en un

aumento de la producción de leche del 2,4%, y del peso vivo del animal de un 2,1%. Además, la leche producida contiene porcentajes de grasa, proteína y lactosa un 1,7, 1,1 y 2,4% más elevados, respectivamente. Esto sugiere que la adición de cultivo de levaduras mejora los rendimientos productivos de los rumiantes, tanto a nivel de ganado de carne como de leche. En este último caso, en nuestro ejemplo de una vaca que ingiere 22 Kg de MS y produce 35 Kg de leche al 3,7% de grasa, con un valor aproximado de 0,25 €/Kg la dieta, 0,07 €/animal y día la adición del producto con levaduras y 0,30 €/kg la leche producida, añadir el producto supondría 0,46 Kg más de alimento para producir 1,14 Kg de leche corregida al 4% de grasa adicionales, con lo que obtendríamos un retorno económico de 1,84 € por euro invertido, por animal y día.

La adición de cultivo de levaduras aumenta la digestibilidad de la MS y de la PB de la ración en un 2,2 y un 4,6%, pero reduce la digestibilidad de la FND y la hemicelulosa en un 4,0 y un 2,7%, respectivamente. Es por esto que, igual que con los productos a base de levaduras vivas, no existe una evidencia clara que confirme la hipótesis que explica el mecanismo de acción de las levaduras basándose en su efecto sobre la digestibilidad de la fibra de la ración. Sin embargo, los aumentos de digestibilidad de MS y PB si hacen pensar que probablemente sean éstos los parámetros relacionados con el mecanismo de acción de los cultivos de levaduras en rumiantes.

Las poblaciones microbianas ruminales aumentan claramente con los cultivos de levaduras, tanto a nivel global (16%), como las bacterias celulolíticas (34%), proteolíticas (54,5%) o los protozoos (4,7%). El aumento de las poblaciones bacterianas es probablemente el origen del aumento de la digestibilidad de la dieta previamente comentado. Sin embargo, en el caso de las bacterias celulolíticas, su aumento no se tradujo en un incremento de la de digestibilidad de la fibra, lo que podría explicarse por un aumento del tránsito digestivo consecuencia de la mayor ingesta de materia seca.

Los efectos de los cultivos de levaduras sobre los parámetros fermentativos en el rumen son leves. El pH ruminal y las producciones de

AGV totales, acético y butírico prácticamente no se ven afectados. Si se observa un aumento en la producción de propiónico (2,3%), con el consecuente descenso en la relación acético:propiónico (1,4%), así como un descenso de la concentración de ácido láctico (2,8%), aunque éste sólo fue determinado en un estudio (Longuski y col, 2009). El efecto más destacable lo vemos en la concentración de AGV ramificados, que aumenta un 9%. Este aumento puede estar contribuyendo al gran crecimiento observado en la población de bacterias celulolíticas, puesto que se ha demostrado que este tipo de organismos, bajo determinadas circunstancias, necesitan de los AGV ramificados para sintetizar determinados aminoácidos (Bryant, 1973).

Finalmente, la concentración de nitrógeno amoniacal en el rumen se reduce en un 6,8%, aunque los resultados observados son muy variables. Esta reducción del amoníaco podría deberse a un aumento de su uso para sintetizar aminoácidos, que junto a la mayor digestibilidad de la PB, nos sugieren un aumento de las necesidades derivadas del crecimiento de las poblaciones microbianas ruminales visto anteriormente.

#### **4.5. Conclusiones**

Tras el análisis de 46 artículos científicos que estudian los efectos de dos tipos de productos a base de levaduras, y teniendo en cuenta la elevada variabilidad que esto conlleva, los resultados obtenidos muestran como los dos tipos de productos analizados parecen aumentar la digestibilidad del alimento, lo cual estaría relacionado con el aumento de la ingesta, la mejora en la producción de leche, y en el caso del cultivo de levaduras, el aumento del peso vivo. El aumento específico de la digestibilidad de la parte fibrosa de la ración es una de las hipótesis más utilizadas para justificar los beneficios de las levaduras. Sin embargo, los resultados no muestran un efecto claro en este sentido.

Los efectos sobre las poblaciones microbianas del rumen muestran diferencias notables entre los dos productos analizados. Mientras la adición de levaduras vivas incrementa claramente la población de protozoos, los cultivos de levaduras aumentan en mayor medida la población microbiana

total y la población de bacterias celulolíticas y proteolíticas. Por tanto, es en este punto donde los mecanismos de acción de ambos productos parecen diferenciarse más, mostrando sus efectos sobre diferentes poblaciones microbianas.

La adición de levaduras muestra leves variaciones en el pH y en el perfil de AGV del rumen. Sin embargo, sí se puede observar un claro descenso de la concentración de ácido láctico en el caso de las levaduras vivas, y un aumento de la concentración de AGV ramificados con los cultivos de levaduras. En cuanto a la concentración de nitrógeno amoniacal, ambos productos muestran efectos opuestos, posiblemente como consecuencia de las distintas poblaciones microbianas estimuladas.

Con todo esto, podemos concluir que las levaduras vivas podrían modificar la fermentación ruminal favoreciendo la población protozoaria y estimulando el consumo, o reduciendo la producción, del ácido láctico. Mientras, los cultivos de levaduras actúan favoreciendo el crecimiento microbiano total, y el de las bacterias celulolíticas en particular, lo que podría contrarrestar el crecimiento excesivo de poblaciones amilolíticas en situaciones de dietas ricas en concentrado. En ambos casos, parece interesante plantear la aplicación de este tipo de productos en situaciones con un elevado riesgo de acidosis como posible alternativa al uso de antibióticos.

## 5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Acamovic, T. y J. D. Brooker. 2005. Biochemistry of plant secondary metabolites and their effects in animals. *Proc. Nutr. Soc.* 64:403-412.
- Aerts, R. J., T. N. Barry, y W. C. McNabb. 1999. Polyphenols and agriculture: beneficial effects of proanthocyanidins in forages. *Agriculture Ecosystems & Environment* 75:1-12.
- Aguilar, A. A. y D. C. Jordan. 1985. Sodium sesquicarbonate for lactating cows. *J Dairy Sci* 68 (Suppl. 1):137-138.
- Allen, M. S. 1997. Relationship between fermentation acid production in the rumen and the requirement for physically effective fiber. *J. Dairy Sci.* 80:1447-1462.
- Allison, M. J., J. A. Bucklin, y R. W. Dougherty. 1964. Ruminant changes after overfeeding with wheat and the effect of intraruminal inoculation on adaptation to a ration containing wheat. *J. Anim. Sci.* 23:1164-1171.
- Andersen, H. J., N. Oksbjerg, y M. Therkildsen. 2005. Potential quality control tools in the production of fresh pork, beef and lamb demanded by the European society. *Livest. Prod. Sci.* 94:105-124.
- AOAC. 1990. Official Methods of Analysis. 15th ed. Assoc. Off. Anal. Chem., Arlington, VA.
- Apper-Bossard E, P. Faverdin, F. Meschy y J. L. Peyraud. 2010. Effects of dietary cation-anion difference on ruminal metabolism and blood acid-base regulation in dairy cows receiving 2 contrasting levels of concentrate in diets. *J. Dairy Sci.* 93:4196-4210.
- Arcos García, J. L., F. A. Castrejón, G. D. Mendoza, y E. P. Pérez Gavilán. 2000. Effect of two commercial yeast cultures with *Saccharomyces cerevisiae* on ruminal fermentation and digestion in sheep fed sugar cane tops. *Livest. Prod. Sci.* 63:153-157.
- Bach, A., C. Iglesias, y M. Devant. 2007. Daily rumen pH pattern of loose-housed dairy cattle as affected by feeding pattern and live yeast supplementation. *Anim. Feed Sci. Technol.* 136:146-153.
- Balcells, J., J. A. Guada, J. M. Peiro, y D. S. Parker. 1992. Simultaneous determination of allantoin and oxypurines in biological fluids by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.* 575:153-157.
- Balch, C. C. 1971. Proposal to use time spent chewing as an index of extent to which diets for ruminants possess physical property of fibrousness characteristic of roughages. *Brit. J. Nutr.* 26:383-392.
- Beauchemin, K. A. y S. M. Mcginn. 2006. Methane emissions from beef cattle: Effects of fumaric acid, essential oil, and canola oil. *J. Anim. Sci.* 84:1489-1496.
- Beauchemin, K. A., S. M. Mcginn, T. F. Martinez, y T. A. McAllister. 2007. Use of condensed tannin extract from quebracho trees to reduce methane emissions from cattle. *J. Anim. Sci.* 85:1990-1996.



- Beharka, A. A. y T. G. Nagaraja. 1998. Effect of *Aspergillus oryzae* extract alone or in combination with antimicrobial compounds on ruminal bacteria. *J. Dairy Sci.* 81:1591-1598
- Beharka, A. A., T. G. Nagaraja, y J. L. Morrill. 1991. Performance and ruminal function development of young calves fed diets with *Aspergillus oryzae* fermentation extract. *J. Dairy Sci.* 74:4326-4336.
- Belibasakis, N. G. y A. Triantos. 1991. Effects of sodium-carbonate on milk-yield, milk-composition, and blood components of dairy-cows in early lactation. *J. Dairy Sci.* 74:467-472.
- Benchaar, C., S. Calsamiglia, A. V. Chaves, G. R. Fraser, D. Colombatto, T. A. McAllister, y K. A. Beauchemin. 2008. A review of plant-derived essential oils in ruminant nutrition and production. *Anim. Feed Sci. Technol.* 145:209-228.
- Benchaar, C., A. V. Chaves, G. R. Fraser, Y. Wang, K. A. Beauchemin, y T. A. McAllister. 2007. Effects of essential oils and their components on in vitro rumen microbial fermentation. *Can. J. Anim. Sci.* 87:413-419.
- Benchaar, C., J. L. Duynisveld, y E. Charmley. 2006. Effects of monensin and increasing dose levels of a mixture of essential oil compounds on intake, digestion and growth performance of beef cattle. *Can. J. Anim. Sci.* 86:91-96.
- Bergen, W. G. y D. B. Bates. 1984. Ionophores: Their effect on production efficiency and mode of action. *J. Anim. Sci.* 58:1465-1483.
- Bevans, D. W., K. A. Beauchemin, K. S. Schwartzkopf-Genswein, J. J. McKinnon, y T. A. McAllister. 2005. Effect of rapid or gradual grain adaptation on subacute acidosis and feed intake by feedlot cattle. *J. Anim. Sci.* 83:1116-1132.
- Blanch, M., S. Calsamiglia, y A. Castelló. 2007. Quantification of *Streptococcus bovis* and *Megasphaera elsdenii* in ruminal fluid of dairy cows and beef heifers by real time PCR technique. (Abstract). *J. Dairy Sci.* 90 (Suppl. 1):339.
- Blanch, M., S. Calsamiglia, N. DiLorenzo, A. DiCostanzo, S. Muetzel, y R. J. Wallace. 2009. Physiological changes in rumen fermentation during acidosis induction and its control using a multivalent polyclonal antibody preparation in heifers. *J. Anim. Sci.* 87:1722-1730.
- Blanch, M., S. Calsamiglia, M. Devant, y A. Bach. 2010. Effects of acarbose on ruminal fermentation, blood metabolites and microbial profile involved in ruminal acidosis in lactating cows fed a high-carbohydrate ration. *J. Dairy Res.* 77:123-128.
- Block, E. 1994. Manipulation of dietary cation-anion difference on nutritionally related production diseases, productivity, and metabolic responses of dairy-cows. *J. Dairy Sci.* 77:1437-1450.
- Boss, D. L. y J. G. P. Bowman. 1996. Barley varieties for finishing steers .2. Ruminal characteristics and rate, site, and extent of digestion. *J. Anim. Sci.* 74:1973-1981.

- Britton, R. A. y R. A. Stock. 1987. Acidosis, rate of starch digestion and intake. Okla. Agric. Exp. Stn. MP-121. pp 125-137.
- Brown, M. S., C. H. Ponce, y R. Pulikanti. 2006. Adaptation of beef cattle to high-concentrate diets: Performance and ruminal metabolism. J. Anim. Sci. 84:E25.
- Bryant, M. P. 1973. Nutritional requirements of the predominant rumen cellulolytic bacteria. Fed. Proc. 32:1809-1813.
- Bryant, M. P. y R. N. Doetsch. 1955. Factors Necessary for the Growth of Bacteroides-Succinogenes in the Volatile Acid Fraction of Rumen Fluid. J. Dairy Sci. 38:340-350.
- Burt, S. 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods - A review. Int. J. Food Microbiol. 94:223-253.
- Callaway, E. S. y S. A. Martin. 1997. Effects of a *Saccharomyces cerevisiae* culture on ruminal bacteria that utilize lactate and digest cellulose. J. Dairy Sci. 80:2035-2044.
- Callaway, T. R. y S. A. Martin. 1996. Effects of organic acid and monensin treatment on in vitro mixed ruminal microorganism fermentation of cracked corn. J. Anim. Sci. 74:1982-1989.
- Calsamiglia, S., M. Blanch, A. Ferret, y D. Moya. 2010. Is acidosis a pH related problem? Causes and tools for its control. Anim. Feed Sci. Technol. In Press.
- Calsamiglia, S., M. Busquet, P. W. Cardozo, L. Castillejos, y A. Ferret. 2007. Essential oils as modifiers of rumen microbial fermentation. J. Dairy Sci. 90:2580-2595.
- Calsamiglia, S., P. W. Cardozo, A. Ferret, y A. Bach. 2008. Changes in rumen microbial fermentation are due to a combined effect of type of diet and pH. J. Anim. Sci. 86:702-711.
- Cardozo, P. W., S. Calsamiglia, A. Ferret, y C. Kamel. 2005. Screening for the effects of natural plant extracts at two pH levels on in vitro rumen microbial fermentation of a high-concentrate beef cattle diet. J. Anim. Sci. 83:49-50.
- Carro, M. D., P. Lebzien, y K. Rohr. 1992a. Effects of yeast culture on rumen fermentation, digestibility and duodenal flow in dairy-cows fed a silage based diet. Livest. Prod. Sci. 32:219-229.
- Carro, M. D., P. Lebzien, y K. Rohr. 1992b. Influence of yeast culture on the in vitro Fermentation (Rusitec) of diets containing variable portions of concentrates. Anim. Feed Sci. Technol. 37:209-220.
- Carro, M. D. y M. J. Ranilla. 2003. Effect of the addition of malate on in vitro rumen fermentation of cereal grains. Brit. J. Nutr. 89:181-188.
- Carulla, J. E., M. Kreuzer, A. Machmuller, y H. D. Hess. 2005. Supplementation of *Acacia mearnsii* tannins decreases methanogenesis and urinary nitrogen in forage-fed sheep. Austr. J. Agric. Res. 56:961-970.

- Cassida, K. A., L. D. Muller, y T. F. Sweeney. 1986. Effect of sodium bicarbonate and sodium sesquicarbonate on animal performance, rumen fermentation and metabolism, and salivation rates of Holstein cows. *J. Dairy Sci.* 69 (Suppl. 1):155.
- Cassida, K. A., L. D. Muller, y T. F. Sweeney. 1988. Sodium sesquicarbonate for early lactation dairy cows fed corn silage-based diets. *J. Dairy Sci.* 71:381-387.
- Castillejos, L., S. Calsamiglia, y A. Ferret. 2006. Effect of essential oil active compounds on rumen microbial fermentation and nutrient flow in *in vitro* systems. *J. Dairy Sci.* 89:2649-2658.
- Castillejos, L., S. Calsamiglia, A. Ferret, y R. Losa. 2005. Effects of a specific blend of essential oil compounds and the type of diet on rumen microbial fermentation and nutrient flow from a continuous culture system. *Anim. Feed Sci. Technol.* 119:29-41.
- Castillejos, L., S. Calsamiglia, A. Ferret, y R. Losa. 2007. Effects of dose and adaptation time of a specific blend of essential oil compounds on rumen fermentation. *Anim. Feed Sci. Technol.* 132:186-201.
- Castillo, C., J. L. Benedito, J. Méndez, V. Pereira, M. López Alonso, M. Miranda, y J. Hernández. 2004. Organic acids as a substitute for monensin in diets for beef cattle. *Anim. Feed Sci. Technol.* 115:101-116.
- Cerrato, M., S. Calsamiglia, y A. Ferret. 2006. The negative effects of one cycle of eight hours at suboptimal pH on rumen fermentation are not reduced by splitting it into various cycles. *J. Anim. Sci.* 84:86-87.
- Cerrato-Sanchez, M., S. Calsamiglia, y A. Ferret. 2008. Effect of the magnitude of the decrease of rumen pH on rumen fermentation in a dual-flow continuous culture system. *J. Anim. Sci.* 86:378-383.
- Chademana, I. y N. W. Offer. 1990. The effect of dietary inclusion of yeast culture on digestion in the sheep. *Anim. Prod.* 50:483-489.
- Chamberlain, D. G., P. C. Thomas, W. Wilson, C. J. Newbold, y J. C. Macdonald. 1985. The effects of carbohydrate supplements on ruminal concentrations of ammonia in animals given diets of grass-silage. *J. Agricul. Sci.* 104:331-340.
- Chaney, A. L. y E. P. Marbach. 1962. Modified reagents for determination of urea and ammonia. *Clin. Chem.* 8:130-132.
- Chaucheyras, F., G. Fonty, G. Bertin, J. M. Salmon, y P. Gouet. 1996. Effects of a strain of *Saccharomyces cerevisiae* (Levucell<sup>(R)</sup> SC1), a microbial additive for ruminants, on lactate metabolism *in vitro*. *Can. J. Microbiol.* 42:927-933.
- Cheeke, P. R. 2000. Actual and potential applications of *Yucca schidigera* and *Quillaja saponaria* saponins in human and animal nutrition. *Proc. Am. Soc. Anim. Sci.*
- Cheng, K. J., R. Hironaka, G. A. Jones, T. Nicas, y J. W. Costerton. 1976. Frothy feedlot bloat in cattle: production of extracellular polysaccharides and development of viscosity in cultures of *Streptococcus bovis*. *Can. J. Microbiol.* 22:450-459.

- Cheng, K. J., T. A. McAllister, J. D. Popp, A. N. Hristov, Z. Mir, y H. T. Shin. 1998. A review of bloat in feedlot cattle. *J. Anim. Sci.* 76:299-308.
- Christiansen, M. L. y K. E. Jr. Webb. 1990. Intestinal acid flow, dry matter, starch and protein digestibility and amino acid absorption in beef cattle fed a high-concentrate diet with defluorinated rock phosphate, limestone or magnesium oxide. *J. Anim. Sci.* 68:2105-2118.
- Clark, J. H., R. A. Christensen, H. G. Bateman, y K. R. Cummings. 2009. Effects of sodium sesquicarbonate on dry matter intake and production of milk and milk components by Holstein cows. *J. Dairy Sci.* 92:3354-3363.
- Clarke, R. T. y C. S. Reid. 1974. Foamy bloat of cattle. A review. *J. Dairy Sci.* 57:753-785.
- Coe, M. L., T. G. Nagaraja, Y. D. Sun, N. Wallace, E. G. Towne, K. E. Kemp, y J. P. Hutcheson. 1999. Effect of virginiamycin on ruminal fermentation in cattle during adaptation to a high concentrate diet and during an induced acidosis. *J. Anim. Sci.* 77:2259-2268.
- Coleman, G. S. 1988. Protozoal-bacterial interaction in the rumen. In *The roles of protozoa and fungi in ruminant digestion. Proceedings of the International Seminar at the University of New England, Penambul Books: NSW, Australia*, pp 13-28.
- Corrigan, M. E., T. J. Klopfenstein, G. E. Erickson, N. F. Meyer, K. J. Vander Pol, M. A. Greenquist, M. K. Luebbe, K. K. Karges, y M. L. Gibson. 2009. Effects of level of condensed distillers solubles in corn dried distillers grains on intake, daily body weight gain, and digestibility in growing steers fed forage diets. *J. Anim. Sci.* 87:4073-4081.
- Cosentino, S., C. I. G. Tuberoso, B. Pisano, M. Satta, V. Mascia, E. Arzedi, y F. Palmas. 1999. In-vitro antimicrobial activity and chemical composition of Sardinian Thymus essential oils. *Letters in Applied Microbiology* 29:130-135.
- DANMAP. 2010. Fact sheets on the Danish restrictions of non-therapeutical use of antibiotics for growth promotion and its consequences. Ministry of Food, Agriculture and Fisheries, Danish Veterinary and Food Administration.
- Desnoyers, M., S. Giger-Reverdin, G. Bertin, C. Duvaux-Ponter, y D. Sauvant. 2009. Meta-analysis of the influence of *Saccharomyces cerevisiae* supplementation on ruminal parameters and milk production of ruminants. *J. Dairy Sci.* 92:1620-1632
- Devant, M. 2008. Acidosis ruminal y timpanismo en terneros de cebo ¿Qué sabemos realmente? Congreso ANEMBE, Salamanca.
- DeVries, T. J. 2010. Review: Behaviour and its role in the nutritional management of the growing dairy heifer. *Can. J. Anim. Sci.* 90:295-302.
- DiLorenzo, N., F. González, y A. DiCostanzo. 2006. Effects of feeding polyclonal antibody preparations on ruminal bacterial populations and ruminal pH of steers fed high-grain diets. *J. Anim. Sci.* 84:2178-2185.
- Dirksen, G. U., H. G. Liebich, y E. Mayer. 1985. Adaptative changes of the ruminal mucosa and their functional and clinical significance. *Bovine Practitioner* 20:116-120.

- Dohme, F., T. J. DeVries, y K. A. Beauchemin. 2008. Repeated ruminal acidosis challenges in lactating dairy cows at high and low risk for developing acidosis: ruminal pH. *J. Dairy Sci.* 91:3554-3567.
- Dorman, H. J. D. y S. G. Deans. 2000. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *J. Appl. Microbiol.* 88:308-316.
- Durand-Chaucheyras, F., G. Fonty, G. Bertin, M. Theveniot, y P. Gouet. 1998. Fate of Levucell SC I-1077 yeast additive during digestive transit in lambs. *Reprod. Nutr. Dev.* 38:275-280.
- Dutil, L., R. Irwin, R. Finley, B. Avery, y P. Boerlin. 2010. Ceftiofur resistance in *Salmonella enterica* serovar Heidelberg from chicken meat and humans. *Emerg. Infect. Dis.* 16:48-54.
- Elam, C. J. 1976. Acidosis in feedlot cattle – Practical observations. *J. Anim. Sci.* 43:898-901.
- Emery, R. S. y L. D. Brown. 1961. Effect of feeding sodium and potassium bicarbonate on milk fat, rumen pH, and volatile fatty acid production. *J. Dairy Sci.* 44:1899-1902.
- Emery, R. S., L. D. Brown, y J. W. Bell. 1965. Supplementing restricted roughage rations with magnesium oxide or sodium bicarbonate prevents milk fat depression. *J. Dairy Sci.* 48:809-816.
- Erasmus, L. J., P. M. Botha, y A. Kistner. 1992. Effect of yeast culture supplement on production, rumen fermentation, and duodenal nitrogen flow in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 75:3056-3065.
- Erdman, R. A. 1988. Dietary buffering requirements of the lactating dairy cow - A review. *J. Dairy Sci.* 71:3246-3266.
- Erdman, R. A., R. L. Botts, R. W. Hemken, y L. S. Bull. 1980. Effect of dietary-sodium bicarbonate and magnesium-oxide on production and physiology in early lactation. *J. Dairy Sci.* 63:923-930.
- Erdman, R. A., R. W. Hemken, y L. S. Bull. 1982. Dietary-sodium bicarbonate and magnesium-oxide for early postpartum lactating dairy-cows: effects on production, acid-base metabolism, and digestion. *J. Dairy Sci.* 65:712-731.
- Essig, H. W., G. B. Huntington, R. J. Emerick, y J. R. Carlson. 1988. Nutritional problems related to the gastrointestinal tract. D. C. Church. The ruminant animal: digestive physiology and nutrition. Prentice Hall, Englewood Cliffs, NJ.
- European Union. 2003. Regulation (EC) No 1831/2003 of the European Parliament and of the council of 22 September 2003 on additives for use in animal nutrition. *Off. J. Eur. Union* 10/18/2003:L268-29-L268/43.
- Foley, P., J. Callan, D. Kenny, T. Boland, y F. O'Mara. 2007. Effect of level of dietary malic acid supplementation on rumen methanogenesis and fermentation in beef cattle. *J. Anim. Sci.* 85:341.
- Fonty, G. y F. Chaucheyras-Durand. 2006. Effects and modes of action of live yeasts in the rumen. *Biologia* 61:741-750.

- Forbes, J. M. y J. P. Barrio. 1992. Abdominal chemo- and mechanosensitivity in ruminants and its role in the control of food intake. *Exp. Physiol* 77:27-50.
- Francis, G., Z. Kerem, H. P. S. Makkar, y K. Becker. 2002. The biological action of saponins in animal systems: a review. *Brit. J. Nutr.* 88:587-605.
- Frumholtz, P. P., C. J. Newbold, y R. J. Wallace. 1989. Influence of *Aspergillus oryzae* fermentation extract on the fermentation of a basal ration in the rumen simulation technique (Rusitec). *J. Agric. Sci. (Camb.)* 113:169-172.
- Garret, E. F., K. V. Nordlund, W. J. Goodger, y G. R. Oetzel. 1997. A cross-sectional field study investigating the effect of periparturient dietary management on ruminal pH in early lactation dairy cows. *J. Dairy Sci.* 80 (Suppl. 1), 169 (Abstract).
- Ghorbani, G. R., J. A. Jackson, y R. W. Hemken. 1989. Effects of sodium-bicarbonate and sodium sesquicarbonate on animal performance, ruminal metabolism, and systemic acid-base status. *J. Dairy Sci.* 72:2039-2045.
- Ghorbani, G. R., D. P. Morgavi, K. A. Beauchemin, y J. A. Z. Leedle. 2002. Effects of bacterial direct-fed microbials on ruminal fermentation, blood variables, and the microbial populations of feedlot cattle. *J. Anim. Sci.* 80:1977-1985.
- Gibb, D. J., T. A. McAllister, C. Huisma, y R. D. Wiedmeier. 1998. Bunk attendance of feedlot cattle monitored with radio frequency technology. *Can. J. Anim. Sci.* 78:707-710.
- Gill, H. S., Q. Shu, y R. A. Leng. 2000. Immunization with *Streptococcus bovis* protects against lactic acidosis in sheep. *Vaccine* 18:2541-2548.
- Goad, D. W., C. L. Goad, y T. G. Nagaraja. 1998. Ruminal microbial and fermentative changes associated with experimentally induced subacute acidosis in steers. *J. Anim. Sci.* 76:234-241.
- González, L. A. 2005. Efecto de la dosis de bicarbonato sódico en piensos para terneras en cebo intensivo sobre la ingestión de materia seca, el consumo de agua y la fermentación ruminal. Trabajo de Máster, Universidad Autónoma de Barcelona.
- González, L. A., A. Ferret, X. Manteca, y S. Calsamiglia. 2008. Increasing sodium bicarbonate level in high-concentrate diets for heifers I. Effects on intake, water consumption and ruminal fermentation. *Animal* 2:705-712.
- Gorosito, A. R., J. B. Russell, y P. J. Vansoest. 1985. Effect of carbon-4 and carbon-5 volatile fatty-acids on digestion of plant-cell wall in vitro. *J. Dairy Sci.* 68:840-847.
- Grant, R. J. y J. L. Albright. 1995. Feeding-behavior and management factors during the transition period in dairy-cattle. *J. Anim. Sci.* 73:2791-2803.
- Grant, R. J. y J. L. Albright. 2001. Effect of animal grouping on feeding behavior and intake of dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 84:E156-E163. (Abstract)
- Helander, I. M., H. L. Alakomi, K. Latva-Kala, T. Mattila-Sandholm, I. Pol, E. J. Smid, L. G. M. Gorris, y A. von Wright. 1998. Characterization of the action of selected essential oil components on gram-negative bacteria. *J. Agricul. Food Chem.* 46:3590-3595.

- Henning, P. H., C. H. Horn, K. J. Leeuw, H. H. Meissner, y F. M. Hagg. 2010a. Effect of ruminal administration of the lactate-utilizing strain *Megasphaera elsdenii* (Me) NCIMB 41125 on abrupt or gradual transition from forage to concentrate diets. *Anim. Feed Sci. Technol.* 157:20-29.
- Henning, P. H., C. H. Horn, D. G. Steyn, H. H. Meissner, y F. M. Hagg. 2010b. The potential of *Megasphaera elsdenii* isolates to control ruminal acidosis. *Anim. Feed Sci. Technol.* 157:13-19.
- Hernández Bermúdez, J. 2002. Lactoacidosis ruminal en terneros de cebo. Congreso de la Sociedad Española de Medicina Interna Veterinaria, Universidad de León. 96-102.
- Herrera Saldana, R. E., J. T. Huber, y M. H. Poore. 1990. Dry-matter, crude protein, and starch degradability of 5 cereal-grains. *J. Dairy Sci.* 73:2386-2393.
- Hervas, G., P. Frutos, F. J. Giraldez, A. R. Mantecon, y M. C. A. Del Pino. 2003. Effect of different doses of quebracho tannins extract on rumen fermentation in ewes. *Anim. Feed Sci. Technol.* 109:65-78.
- Hession, A. O., R. S. Tung, E. M. Kreck, y Jr. L. Kung. 1992. Effect of adding live yeast cultures on in vitro ruminal fermentation. *J. Anim. Sci.* 70 (Suppl. 1):309. (Abstract).
- Hickman, D. D., T. A. McAllister, K. S. Schwartzkopf-Genswein, D. H. Crews, Jr., C. R. Krehbiel, y R. Silasi. 2002. Relationship between feeding behavior and performance of feedlot steers. *J. Anim. Sci.* 80(Suppl. 1):15.
- Hoover, W. H., B. A. Crooker, y C. J. Sniffen. 1976. Effects of differential solid-liquid removal rates on protozoa numbers in continuous cultures of rumen contents. *J. Anim. Sci.* 43:528-534.
- Horn, C. H., A. Kistner, y G. Fouche. 2009. Selective enrichment, isolation and characterisation of fast-growing acid-tolerant lactate utilisers from rumen contents of animals on high-energy diets. En: *Ruminant Physiology: Digestion, Metabolism, and Effects of Nutrition on Reproduction and Welfare*. En: Proc. X1th International Symposium on Ruminant Physiology, Clermont-Ferrand, September 6-9, 2009. 216-217.
- Howarth, R. E., R. K. Chaplin, K. J. Cheng, B. P. Goplen, J. W. Hall, R. Hironaka, W. Majak, y O. M. Radostits. 1991. Bloat in cattle. *Agriculture Canada Publication 1858/E1-32*.
- Hristov, A. N., T. A. McAllister, F. H. Van Herk, K. J. Cheng, C. J. Newbold, y P. R. Cheeke. 1999. Effect of *Yucca schidigera* on ruminal fermentation and nutrient digestion in heifers. *J. Anim. Sci.* 77:2554-2563.
- Hu, W. y M. R. Murphy. 2004. A statistical evaluation of early- or mid-lactation dairy cow responses to dietary sodium bicarbonate. *J. Anim. Sci.* 82:48.
- Huber, J. T., R. S. Emery, J. W. Thomas, y I. M. Yousef. 1969. Milk fat synthesis on restricted-roughage rations containing whey sodium bicarbonate and magnesium oxide. *J. Dairy Sci.* 52:54-&.
- Huber, T. L., J. H. Cooley, D. D. Goetsch, y N. K. Das. 1976. Lactic acid-utilizing bacteria in ruminal fluid of a steer adapted from hay feeding to a high-grain ration. *Am. J. Vet. Res.* 37:611-613.

- Jensen, M. T., R. P. Cox, y B. B. Jensen. 1995. Microbial-production of skatole in the hind gut of pigs given different diets and its relation to skatole deposition in backfat. *Anim. Sci.* 61:293-304.
- Jouany, J. P. 1982. Volatile fatty acids and alcohol determination in digestive contents, silage juice, bacterial cultures and anaerobic fermenter contents. *Sci. Aliments* 2:131-144.
- Jung, H. G. y M. S. Allen. 1995. Characteristics of plant-cell walls affecting intake and digestibility of forages by ruminants. *J. Anim. Sci.* 73:2774-2790.
- Kay, R. N. 1966. The influence of saliva on digestion in ruminants. *World Rev. Nutr. Diet.* 6:292-325.
- Kleen, J. L., G. A. Hooijer, J. Rehage, y J. P. T. M. Noordhuizen. 2003. Subacute ruminal acidosis (SARA): a review. *Journal of Veterinary Medicine Series A-Physiology Pathology Clinical Medicine* 50:406-414.
- Kleen J. L., G. A. Hooijer, J. Rehage y J. P. Noordhuizen. 2009. Subacute ruminal acidosis in Dutch dairy herds. *Vet. Rec.* 164:681-683.
- Klieve, A. V., D. Hennessy, D. Ouwkerk, R. J. Forster, R. I. Mackie, y G. T. Attwood. 2003. Establishing populations of *Megasphaera elsdenii* YE 34 and *Butyrivibrio fibrisolvens* YE 44 in the rumen of cattle fed high grain diets. *J. Appl. Microbiol.* 95:621-630.
- Klopfenstein, T. J., G. E. Erickson, y V. R. Bremer. 2008. Board invited review: Use of distillers by-products in the beef cattle feeding industry. *J. Anim. Sci.* 86:1223-1231.
- Kohn, R. A. y T. F. Dunlap. 1998. Calculation of the buffering capacity of bicarbonate in the rumen and in vitro. *J. Anim. Sci.* 76:1702-1709.
- Krause, K. M. y G. R. Oetzel. 2006. Understanding and preventing subacute ruminal acidosis in dairy herds: A review. *Anim. Feed Sci. Technol.* 126:215-236.
- Krehbiel, C. R., S. R. Rust, G. Zhang, y S. E. Gilliland. 2003. Bacterial direct-fed microbials in ruminant diets: Performance response and mode of action. *J. Anim. Sci.* 81:E120-E132.
- Krueger, W. K., H. Gutierrez-Banuelos, G. E. Carstens, B. R. Min, W. E. Pinchak, R. R. Gomez, R. C. Anderson, N. A. Krueger, y T. D. A. Forbes. 2010. Effects of dietary tannin source on performance, feed efficiency, ruminal fermentation, and carcass and non-carcass traits in steers fed a high-grain diet. *Anim. Feed Sci. Technol.* 159:1-9.
- Kung, L. M. y A. O. Hession. 1995. Preventing in vitro lactate accumulation in ruminal fermentations by inoculation with *Megasphaera elsdenii*. *J. Anim. Sci.* 73:250-256.
- Leruyet, P. y W. B. Tucker. 1992. Ruminal buffers - Temporal effects on buffering capacity and pH of ruminal fluid from cows fed a high concentrate diet. *J. Dairy Sci.* 75:1069-1077.



- Lescoat, P., D. Ali-Haimoud-Lekhal, y C. Bayourthe. 2000. Effets de *Saccharomyces cerevisiae* et *Aspergillus oryzae* sur la digestion et le fonctionnement ruminal: Étude bibliographique. Page 199 in 7èmes Rencontres autour des Recherches sur les Ruminants, Paris, France.
- Leventini, M. W., C. W. Hunt, R. E. Roffler y D. G. Casebolt. 1990. Effect of dietary level of barley-based supplements and ruminal buffer on digestion and growth by beef cattle. *J. Anim. Sci.* 68:4334-4344.
- Lila, Z. A., N. Mohammed, T. Yasui, Y. Kurokawa, S. Kanda, y H. Itabashi. 2004. Effects of a twin strain of *Saccharomyces cerevisiae* live cells on mixed ruminal microorganism fermentation in vitro. *J. Anim. Sci.* 82:1847-1854.
- Longuski, R. A., Y. Ying y M. S. Allen. 2009. Yeast culture supplementation prevented milk fat depression by a short-term dietary challenge with fermentable starch. *J. Dairy Sci.* 92:160-167.
- López i Gelats, F. 2010. Are mountains leaving agriculture behind? The complex dynamics of agricultural abandonment in the Pyrenees. Tesis Doctoral, Universitat Autònoma de Barcelona.
- Lynch, H. A. y S. A. Martin. 2002. Effects of *Saccharomyces cerevisiae* culture and *Saccharomyces cerevisiae* live cells on in vitro mixed ruminal microorganism fermentation. *J. Dairy Sci.* 85:2603-2608.
- Majak, W., J. W. Hall, y W. P. McCaughey. 1995. Pasture management strategies for reducing the risk of legume bloat in cattle. *J. Anim. Sci.* 73:1493-1498.
- Mangan, J. L. 1959. Bloat in cattle. *Proc. R Soc. Med.* 52:376-379.
- Mansfield, H. R., M. I. Endres, y M. D. Stern. 1994. Influence of non-fibrous carbohydrate and degradable intake protein on fermentation by ruminal microorganisms in continuous culture. *J. Anim. Sci.* 72:2464-2474.
- Mapiye, C., M. Chimonyo, K. Dzama, P. E. Strydom, V. Muchenje, y M. C. Marufu. 2009. Nutritional status, growth performance and carcass characteristics of Nguni steers supplemented with *Acacia karroo* leaf-meal. *Lives. Sci.* 126:206-214.
- Marden, J. P., C. Julien, V. Monteils, E. Auclair, R. Moncoulon y C. Bayourthe. 2008. How does live yeast differ from sodium bicarbonate to stabilize ruminal pH in high-yielding dairy cows?. *J. Dairy Sci.* 91:3528-3535.
- Martin, S. A. 1998. Manipulation of ruminal fermentation with organic acids: A review. *J. Anim. Sci.* 76:3123-3132.
- Martin, S. A., M. N. Streeter, D. J. Nisbet, G. M. Hill, y S. E. Williams. 1999. Effects of DL-malate on ruminal metabolism and performance of cattle fed a high-concentrate diet. *J. Anim. Sci.* 77:1008-1015.
- McAllister, T. A., R. J. Forster, R. M. Teather, R. Sharma, G. T. Attwood, L. B. Selinger, y K. N. Joblin. 2006. Chapter 19 Manipulation and characterization of the rumen ecosystem through biotechnology. Pag. 559 en: *Biology of Growing Animals Biology of Nutrition in Growing Animals*. R. Mosenthin, ed. Elsevier.

- McAllister, T. A., T. Martinez, H. D. Bae, A. D. Muir, L. J. Yanke, y G. A. Jones. 2005. Characterization of condensed tannins purified from legume forages: Chromophore production, protein precipitation, and inhibitory effects on cellulose digestion. *Journal of Chemical Ecology* 31:2049-2068.
- Mccarthy, R. D., T. H. Klusmeyer, J. L. Vicini, J. H. Clark, y D. R. Nelson. 1989. Effects of source of protein and carbohydrate on ruminal fermentation and passage of nutrients to the small-intestine of lactating cows. *J. Dairy Sci.* 72:2002-2016.
- Merrill, J. 1994. A Canadian feedlot health and nutrition symposium. Rumensin field trial results. Elanco Animal Health, Lethbridge, AB, Canada.
- Meyer, N. F., G. E. Erickson, T. J. Klopfenstein, M. A. Greenquist, M. K. Luebbe, P. Williams, y M. A. Engstrom. 2009. Effect of essential oils, tylosin, and monensin on finishing steer performance, carcass characteristics, liver abscesses, ruminal fermentation, and digestibility. *J. Anim. Sci.* 87:2346-2354.
- Miller-Webster, T., W. H. Hoover, M. Holt, y J. E. Nocek. 2002. Influence of yeast culture on ruminal microbial metabolism in continuous culture. *J. Dairy Sci.* 85:2009-2014.
- Min, B. R., W. E. Pinchak, R. C. Anderson, y M. E. Hume. 2006. In vitro bacterial growth and in vivo ruminal microbiota populations associated with bloat in steers grazing wheat forage. *J. Anim. Sci.* 84:2873-2882.
- Min, B. R., W. E. Pinchak, J. D. Fulford, y R. Puchala. 2005. Effect of feed additives on in vitro and in vivo rumen characteristics and frothy bloat dynamics in steers grazing wheat pasture. *Anim. Feed Sci. Technol.* 124:615-629.
- Montano, M. F., W. Chai, T. E. Zinn-Ware, y R. A. Zinn. 1999. Influence of malic acid supplementation on ruminal pH, lactic acid utilization, and digestive function in steers fed high-concentrate finishing diets. *J. Anim. Sci.* 77:780-784.
- Nagaraja, T. G. y M. M. Chengappa. 1998. Liver abscesses in feedlot cattle: A review. *J. Anim. Sci.* 76:287-298.
- Nagaraja, T. G. y K. F. Lechtenberg. 2007. Acidosis in feedlot cattle. *Veterinary Clinics of North America-Food Animal Practice* 23:333-340.
- Nagaraja, T. G., C. J. Newbold, C. J. Van Nevel, y D. I. Demeyer. 1997. Manipulation of ruminal fermentation. In: *The rumen microbial ecosystem*, Hobson, P.N. and Stewart, C.S. (Eds.). Blackie Academic & Professional, London.523-632.
- Nagaraja, T. G. y E. C. Titgemeyer. 2006. Ruminal acidosis in beef cattle: The current microbiological outlook. *J. Anim. Sci.* 84:153.
- Nagaraja, T. G. y E. C. Titgemeyer. 2007. Ruminal acidosis in beef cattle: The current microbiological and nutritional outlook. *J. Dairy Sci.* 90:E17-E38.
- Newbold, C. J., F. M. McIntosh, y R. J. Wallace. 1998. Changes in the microbial population of a rumen-simulating fermenter in response to yeast culture. *Can. J. Anim. Sci.* 78:241-244.

- Newbold, C. J., F. M. McIntosh, P. Williams, R. Losa, y R. J. Wallace. 2004. Effects of a specific blend of essential oil compounds on rumen fermentation. *Anim. Feed Sci. Technol.* 114:105-112.
- Newbold, C. J., R. J. Wallace, y F. M. McIntosh. 1996. Mode of action of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* as a feed additive for ruminants. *Brit. J. Nutr.* 76:249-261.
- Newbold, C. J., P. E. Williams, N. McKain, A. Walker, y R. J. Wallace. 1990. The effects of yeast culture on yeast numbers and fermentation in the rumen of sheep. *Proc. Nutr. Soc.* 49:46A.
- Nisbet, D. J. y S. A. Martin. 1990. Effect of dicarboxylic acids and *Aspergillus oryzae* fermentation extract on lactate uptake by the ruminal bacterium *Selenomonas ruminantium*. *Appl. Environ. Microbiol.* 56:3515-3518.
- Nisbet, D. J. y S. A. Martin. 1991. Effect of a *Saccharomyces cerevisiae* culture on lactate utilization by the ruminal bacterium *Selenomonas ruminantium*. *J. Anim. Sci.* 69:4628-4633.
- Nocek, J. E. 1994. Manipulation of non-structural carbohydrates in rations for dairy cows. *Minn. Nutr. Conf.* 55:165-171.
- Nocek, J. E. 1997. Bovine acidosis: implications on laminitis. *J. Dairy Sci.* 80:1005-1028.
- Nocek, J. E. y W. P. Kautz. 2006. Direct-fed microbial supplementation on ruminal digestion, health, and performance of pre- and post-partum dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 89(1):260-266. (Abstract)
- Nocek, J. E., W. P. Kautz, J. A. Z. Leedle, y J. G. Allman. 2002. Ruminal supplementation of direct-fed microbials on diurnal pH variation and in situ digestion in dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 85:429-433.
- Nocek, J. E. y S. Tamminga. 1991. Site of digestion of starch in the gastrointestinal tract of dairy cows and its effect on milk yield and composition. *J. Dairy Sci.* 74:3598-3629.
- NRC. 1996. Nutrient requirements of beef cattle. 7th ed. Natl. Acad. Press, Washington, DC.
- Oenema, O. 2004. Governmental policies and measures regulating nitrogen and phosphorus from animal manure in European agriculture. *J. Anim. Sci.* 82 E-Suppl:E196-E206.
- Oetzel, G. R. 2003. Subacute ruminal acidosis in dairy cattle. *Advances in Dairy Technology* 15:307-317.
- Oetzel, G. R., K. V. Nordlund, y E. F. Garret. 1999. Effect of ruminal pH and stage of lactation on ruminal lactate concentrations in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 82 (Suppl 1):38 (Abstract).
- Offner, A., A. Bach, y D. Sauvant. 2003. Quantitative review of in situ starch degradation in the rumen. *Anim. Feed Sci. Technol.* 106:81-93.
- Orskov, E. R. 1986. Starch digestion and utilization in ruminants. *J. Anim. Sci.* 63:1624-1633.

- Ouwerkerk, D., A. V. Klieve, y R. J. Forster. 2002. Enumeration of *Megasphaera elsdenii* in rumen contents by real-time Taq nuclease assay. *J. Appl. Microbiol.* 92:753-758.
- Overton, T. R., M. R. Cameron, J. P. Elliott, J. H. Clark, y D. R. Nelson. 1995. Ruminal fermentation and passage of nutrients to the duodenum of lactating cows fed mixtures of corn and barley. *J. Dairy Sci.* 78:1981-1998.
- Owens, F. N., D. S. Secrist, W. J. Hill, y D. R. Gill. 1998. Acidosis in cattle: A review. *J. Anim. Sci.* 76:275-286.
- Paisley, S. L. y G. W. Horn. 1998. Effect of ionophore on rumen characteristics, gas production, and occurrence of bloat in cattle grazing winter wheat pasture. *Oklahoma State Univ., Anim. Sci. Res. Rep.* 141-146.
- Peirce, S. B., L. D. Muller y H. W. Harpster. 1983. Influence of sodium bicarbonate and magnesium oxide on digestion and metabolism in yearling beef steers abruptly changed from high forage to high energy diets. *J. Anim. Sci.* 57:1561-1567.
- Penner, G. B., P. Yu, y D. A. Christensen. 2009. Effect of replacing forage or concentrate with wet or dry distillers' grains on the productivity and chewing activity of dairy cattle. *Anim. Feed Sci. Technol.* 153:1-10.
- Phy, T. S. y F. D. Provenza. 1998. Eating barley too frequently or in excess decreases lambs' preference for barley but sodium bicarbonate and lasalocid attenuate the response. *J. Anim. Sci.* 76:1578-1583.
- Pinares Patiño, C. S., M. J. Ulyatt, G. C. Waghorn, K. R. Lassey, T. N. Barry, C. W. Holmes, y D. E. Johnson. 2003. Methane emission by alpaca and sheep fed on lucerne hay or grazed on pastures of perennial ryegrass/white clover or birdsfoot trefoil. *J. Agricul. Sci.* 140:215-226.
- Plaizier, J. C., D. O. Krause, G. N. Gozho, y B. W. McBride. 2008. Subacute ruminal acidosis in dairy cows: The physiological causes, incidence and consequences. *Veterinary Journal* 176:21-31.
- Pressey, R., R. S. Allen, J. Bertram, S. H. Synhorst, y N. L. Jacobson. 1963. Foaming properties of alfalfa and their relationship to bloat. *J. Anim. Sci.* 22:970-978.
- Pritchard, R. H. y K. W. Bruns. 2003. Controlling variation in feed intake through bunk management. *J. Anim. Sci.* 81(E. Suppl. 2):E133-E138.
- Puchala, R., B. R. Min, A. L. Goetsch, y T. Sahlu. 2005. The effect of a condensed tannin-containing forage on methane emission by goats. *J. Anim. Sci.* 83:182-186.
- Raeth-Knight, M. L., J. G. Linn, y H. G. Jung. 2007. Effect of direct-fed microbials on performance, diet digestibility, and rumen characteristics of Holstein dairy cows. *J. Dairy Sci.* 90:1802-1809.
- Richardson, A. J., A. G. Calder, C. S. Stewart, y A. Smith. 1989. Simultaneous determination of volatile and non-volatile acidic fermentation products of anaerobes by capillary gas-chromatography. *Letters in Applied Microbiology* 9:5-8.

- Robinson, P. H. 2002. Yeast products for growing and lactating dairy cattle: impacts on rumen fermentation and performance. In XII Int. Meet. Milk Meat Prod. Hot Clim., Mexicali, Mexico.
- Robinson, P.H. y L.J. Erasmus. 2009. Effects of analyzable diet components on responses of lactating dairy cows to *Saccharomyces cerevisiae* based yeast products: A systematic review of the literature. Anim. Feed Sci. Technol. 149:185-198
- Rogers, J. A. y C. L. Davis. 1982. Rumen volatile fatty-acid production and nutrient utilization in steers fed a diet supplemented with sodium-bicarbonate and monensin. J. Dairy Sci. 65:944-952.
- Russell, J. B. y J. M. Chow. 1993. Another theory for the action of ruminal buffer salts - Decreased starch fermentation and propionate production. J. Dairy Sci. 76:826-830.
- Russell, J. B. y J. L. Rychlik. 2001. Factors that alter rumen microbial ecology. Science 292:1119-1122.
- Russell, J. B. y D. B. Wilson. 1996. Why are ruminal cellulolytic bacteria unable to digest cellulose at low pH? J. Dairy Sci. 79:1503-1509.
- Sauvant, D., S. Giger-Reverdin, y P. Schmidely. 2004. Rumen acidosis: Modeling ruminant response to yeast culture. En: Alltech's 20th Annu. Symp. Biotechnol. Feed Ind. Reimagining the Feed Industry. T. P. Lyons and K. A. Jacques, ed. Nottingham University Press. 221-229
- Sauvant, D., S. Giger-Reverdin, y F. Meschy. 2006. Le controle de l'acidose ruminale latente. INRA Productions Animales 19:69-78.
- Schingoethe, D. J., K. F. Kalscheur, A. R. Hippen, y A. D. Garcia. 2009. Invited review: The use of distillers' products in dairy cattle diets. J. Dairy Sci. 92:5802-5813.
- Schwartzkopf-Genswein, K. S., S. Atwood, y T. A. McAllister. 2002. Relationships between bunk attendance, intake and performance of steers and heifers on varying feeding regimes. Appl. Anim. Behav. Sci. 76:179-188.
- Schwartzkopf-Genswein, K. S., K. A. Beauchemin, D. J. Gibb, D. H. Crews, Jr., D. D. Hickman, M. Streeter, y T. A. McAllister. 2003. Effect of bunk management on feeding behavior, ruminal acidosis and performance of feedlot cattle: A review. J. Anim. Sci. 81:E149-E158.
- Seymour, W. M., D. R. Campbell, y Z. B. Johnson. 2005. Relationships between rumen volatile fatty acid concentrations and milk production in dairy cows: a literature study. Anim. Feed Sci. Technol. 119:155-169.
- Shaver, R. D. 2002. Rumen acidosis in dairy cattle: bunk management considerations. En: Proc. 12th Int. Symp. on Lameness in Ruminants, Orlando, FL. 75-81
- Shu, Q., H. S. Gill, D. W. Hennessy, R. A. Leng, S. H. Bird, y J. B. Rowe. 1999. Immunisation against lactic acidosis in cattle. Research in Veterinary Science 67:65-71.

- Shu, Q., H. S. Gill, R. A. Leng, y J. B. Rowe. 2000. Immunization with a *Streptococcus bovis* vaccine administered by different routes against lactic acidosis in sheep. *Veterinary Journal* 159:262-269.
- Smith, R. A. 1998. Impact of disease on feedlot performance: A review. *J. Anim. Sci.* 76:272-274.
- Solorzano, L. C., L. E. Armentano, R. R. Grummer, y M. R. Dentine. 1989. Effects of sodium-bicarbonate or sodium sesquicarbonate on lactating Holsteins fed a high grain diet. *J. Dairy Sci.* 72:453-461.
- Staples, C. R. y D. S. Lough. 1989. Efficacy of supplemental dietary neutralizing agents for lactating dairy cows - A review. *Anim. Feed Sci. Technol.* 23:277-303.
- Stone, W. C. 1999. The effect of subclinical rumen acidosis on milk components. En: *Proceedings Cornell Nutrition Conference for Feed Manufacturers*, Cornell University, Ithaca, New York. 40-46.
- Stone, W. C. 2002. The subtleties of yeast. *Feed Mix* 10:32-33.
- Sullivan, H. M. y S. A. Martin. 1999. Effects of a *Saccharomyces cerevisiae* culture on in vitro mixed ruminal microorganism fermentation. *J. Dairy Sci.* 82:2011-2016.
- Sun, Y. Z., S. Y. Mao, y W. Y. Zhu. 2010. Rumen chemical and bacterial changes during stepwise adaptation to a high-concentrate diet in goats. *Animal* 4:210-217.
- Surber, L. M. M. y J. G. P. Bowman. 1998. Monensin effects on digestion of corn or barley high-concentrate diets. *J. Anim. Sci.* 76:1945-1954.
- Tajima, K., S. Arai, K. Ogata, T. Nagamine, H. Matsui, M. Nakamura, R. I. Aminov, y Y. Benno. 2000. Rumen bacterial community transition during adaptation to high-grain diet. *Anaerobe* 6:273-284.
- Tavendale, M. H., L. P. Meagher, D. Pacheco, N. Walker, G. T. Attwood, y S. Sivakumaran. 2005. Methane production from in vitro rumen incubations with *Lotus pedunculatus* and *Medicago sativa*, and effects of extractable condensed tannin fractions on methanogenesis. *Anim. Feed Sci. Technol.* 123:403-419.
- Theodorou, M. K., B. A. Williams, M. S. Dhanoa, A. B. Mcallan, y J. France. 1994. A simple gas-production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feeds. *Anim. Feed Sci. Technol.* 48:185-197.
- Thomas, J. W. y R. S. Emery. 1969. Additive nature of sodium bicarbonate and magnesium oxide on milk fat concentrations of milking cows fed restricted-roughage rations. *J. Dairy Sci.* 52:1762-1772.
- Thompson, P., C. Harris, D. Holt, y E. A. Pajor. 2007. Livestock welfare product claims: The emerging social context. *J. Anim. Sci.* 85:2354-2360.

- Trombetta, D., F. Castelli, M. G. Sarpietro, V. Venuti, M. Cristani, C. Daniele, A. Saija, G. Mazzanti, y G. Bisignano. 2005. Mechanisms of antibacterial action of three monoterpenes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 49:2474-2478.
- Tucker, W. B., I. S. Shin, J. F. Hogue, M. Aslam, G. D. Adams, M. T. Vankoevinger, R. K. Vernon, y K. R. Cummings. 1994. Natural sodium sesquicarbonate fed for an entire lactation - Influence on performance and acid-base status of dairy cows. *J. Dairy Sci.* 77:3111-3117.
- Tukey, J. W. 1953. Some selected quick and easy methods of statistical analysis. *Trans. N. Y Acad. Sci.* 16:88-97.
- Ultee, A., E. P. W. Kets, y E. J. Smid. 1999. Mechanisms of action of carvacrol on the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Applied and Environmental Microbiology* 65:4606-4610.
- Van Soest, P. J. 1982. Nutritional ecology of the ruminant. O&B. Books Inc.
- Van Soest, P. J., J. B. Robertson, y B. A. Lewis. 1991. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and non-starch polysaccharides in relation to animal nutrition. *J. Dairy Sci.* 74:3583-3597.
- Vander Pol, K., G. Erickson, T. Klopfenstein, y M. Greenquist. 2005. Effect of level of wet distillers grains on feedlot performance of finishing cattle and energy value relative to corn. *J. Anim. Sci.* 83:55.
- Vasconcelos, J. T. y M. L. Galyean. 2008. ASAS Centennial Paper: contributions in the *Journal of Animal Science* to understanding cattle metabolic and digestive disorders. *J. Anim. Sci.* 86:1711-1721.
- Voisinet, B. D., T. Grandin, J. D. Tatum, S. F. O'Connor, y J. J. Struthers. 1997. Feedlot cattle with calm temperaments have higher average daily gains than cattle with excitable temperaments. *J. Anim. Sci.* 75:892-896.
- Waghorn, G. C., M. J. Ulyatt, A. John, y M. T. Fisher. 1987. The effect of condensed tannins on the site of digestion of amino-acids and other nutrients in sheep fed on lotus-corniculatus l. *Brit. J. Nutr.* 57:115-126.
- Waldrip, H. M., y S. A. Martin. 1993. Effects of an *Aspergillus oryzae* fermentation extract and other factors on lactate utilization by the ruminal bacterium *Megasphaera elsdenii*. *J. Anim. Sci.* 71:2770-2776.
- Wallace, R. J. 1994. Ruminal microbiology, biotechnology, and ruminant nutrition: Progress and problems. *J. Anim. Sci.* 72:2992-3003.
- Wallace, R. J., N. R. Mcewan, F. M. McIntosh, B. Teferedegne, y C. J. Newbold. 2002. Natural products as manipulators of rumen fermentation. *Asian-Austral. J. Anim. Sci.* 15:1458-1468.
- Wallace, R. J. y C. J. Newbold. 1992. Probiotics for ruminants. R. Fuller Probiotics: The Scientific Basis. Chapman and Hall, London.317.
- Weller, R. A. y A. F. Pilgrim. 1974. Passage of protozoa and volatile fatty-acids from rumen of sheep and from a continuous in vitro fermentation system. *Brit. J. Nutr.* 32:341-351.

- Whitford, M. F., R. J. Forster, C. E. Beard, J. Gong, y R. M. Teather. 1998. Phylogenetic analysis of rumen bacteria by comparative sequence analysis of cloned 16S rRNA genes. *Anaerobe*. 4:153-163.
- Wiedmeier, R. D., M. J. Arambel, y J. L. Walters. 1987. Effect of yeast culture and *Aspergillus oryzae* fermentation extract on ruminal characteristics and nutrient digestibility. *J. Dairy Sci.* 70:2063-2068.
- Wierenga, K. T., T. A. McAllister, D. J. Gibb, A. V. Chaves, E. K. Okine, K. A. Beauchemin, y M. Oba. 2010. Evaluation of triticale dried distillers' grain as a substitute for barley grain and barley silage in feedlot finishing diets. *J. Anim. Sci.*
- Williams, A. G. y G. S. Coleman. 1988. The rumen protozoa. En: *The rumen microbial ecosystem*. Elsevier Science Publishers LTD, Essex, UK. 77-128.
- Wina, E., S. Muetzel, y K. Becker. 2005. The impact of saponins or saponin-containing plant materials on ruminant production. A review. *J. Agri. Food Chem.* 53:8093-8105.
- Winter, K. A., R. R. Johnson, y B. A. Dehority. 1964. Metabolism of urea nitrogen by mixed cultures of rumen bacteria grown on cellulose. *J. Dairy Sci.* 47:793-797.
- Wiryawan, K. G. y J. D. Brooker. 1995. Probiotic control of lactate accumulation in acutely grain-fed sheep. *Austr. J. Agric. Res.* 8:1555-1568.
- Wohlt, J. E., A. D. Finkelstein, y C. H. Chung. 1991. Yeast culture to improve intake, nutrient digestibility, and performance by dairy cattle during early lactation. *J. Dairy Sci.* 74:1395-1400.
- Woodward, S. L., G. C. Waghorn, K. R. Lassey, y P. Laboyre. 2002. Does feeding sulla (*Hedysaurum coronarium*) reduce methane emissions from dairy cows? *Proc. N. Z. Soc. Anim. Prod.* 6:227-230.
- Yang, W. Z., K. A. Beauchemin, D. D. Vedres, G. R. Ghorbani, D. Colombatto, y D. P. Morgavi. 2004. Effects of direct-fed microbial supplementation on ruminal acidosis, digestibility, and bacterial protein synthesis in continuous culture. *Anim. Feed Sci. Technol.* 114:179-193.
- Yoon, I. K. y M. D. Stern. 1995. Influence of direct-fed microbials on ruminal microbial fermentation and performance of ruminants. A review. *Asian-Australas. J. Anim. Sci.* 8:533-555.
- Zinn, R. A. 1994. Influence of fluctuation in feed intake on feedlot cattle growth performance and digestive function. En: *Proc. Southwest Nutr. Mgmt. Conf., Univ. of Arizona, Tucson*. 71





## **CAPÍTULO II**

### **Objetivos**



### **Objetivo general**

Los trabajos que se presentan a continuación pertenecen a una tesis doctoral que tiene como objetivo explorar las alternativas existentes a los antibióticos promotores del crecimiento para prevenir y/o controlar la aparición de trastornos digestivos.

### **Objetivos específicos**

#### ***Primer trabajo***

Evaluar los efectos del tipo de cereal (maíz vs cebada) y la adición de levaduras vivas sobre el perfil de fermentación ruminal y las poblaciones microbianas en un sistema de fermentación ruminal de doble flujo continuo.

#### ***Segundo trabajo***

Describir los cambios ocurridos en el rumen durante un trastorno digestivo inducido mediante un cambio brusco de una dieta forrajera a otra rica en concentrado, y evaluar los efectos de un cultivo de levaduras sobre la fermentación microbiana ruminal de terneras durante dicho trastorno digestivo.

#### ***Tercer trabajo***

Determinar si terneras de engorde alimentadas con diferentes ingredientes por separado seleccionan una dieta que reduzca la incidencia de acidosis sin afectar su productividad.



## **CAPÍTULO III**

### **Live yeast on rumen microbial fermentation**

*Capítulo basado en el artículo enviado a Animal Feed Science and Technology*



**Running head:** Live yeast on rumen microbial fermentation

**Effects of live yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) and type of cereal on rumen microbial fermentation in a dual flow continuous culture fermentation system<sup>1</sup>.**

D. Moya, S. Calsamiglia<sup>2</sup>, A. Ferret, M. Blanch, M.C. Fuentes and J.I. Fandiño

Grup de Recerca en Nutrició, Maneig i Benestar Animal, Departament de Ciència Animal i dels Aliments, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193-Bellaterra, Spain.

<sup>1</sup> Financial support and technical assistance provided by Lallemand SAS.

<sup>2</sup> Correspondence author: [sergio.calsamiglia@uab.cat](mailto:sergio.calsamiglia@uab.cat)



**ABSTRACT:** Eight 1320-mL dual flow continuous culture fermenters were used in a 2 x 2 factorial design in two replicated periods of 9 days (6 for adaptation and 3 for sampling) to determine the effect of live yeast and type of cereal on rumen microbial fermentation and nutrient digestibility. Main factors were live yeast (Levucell®SC): no yeast (NY) vs  $2 \times 10^7$  CFU of yeast/g of diet (LY); and type of predominant cereal in the diet: corn concentrate (CO, 550 g ground corn/kg DM; 172 g CP/kg DM, 228 g aNDF/kg DM) vs barley concentrate (BA, 892 g barley grain/kg DM; 161 g CP/kg DM, 160 g aNDF/kg DM). All fermenters were fed 80 g DM/d of a 10 to 90 forage to concentrate diet in three equal amounts at 8 h interval. Fermentation temperature (38.5° C) and liquid ( $0.12 \text{ h}^{-1}$ ) and solid ( $0.06 \text{ h}^{-1}$ ) dilution rates were maintained constant. The pH was allowed to fluctuate with an upper (6.6) and lower (5.5) limit controlled by infusion of 3 M HCl or 5 M NaOH. Liquid effluent samples were taken to determine VFAs and N fractions concentrations, N flow, and copies of the 16s rRNA gene of *Streptococcus bovis* and *Megasphaera elsdenii*, determined by quantitative PCR. Effluent samples were taken from a composite of the three sampling days. Bacteria were isolated from fermenter flasks on the last day of each period for chemical analysis. Treatment BA increased ( $P < 0.05$ ) OM digestion, valerate proportion, peptides and ammonia N fractions, ammonia N flow, CP degradation, and target copies of *M. elsdenii*; and decreased ( $P < 0.05$ ) aNDF digestion, propionate proportion, branched chain VFA (BCVFA) concentration, AA-N fraction, and non-ammonia N flow. Treatment LY increased ( $P < 0.01$ ) BCVFA, and decreased ( $P < 0.05$ ) ammonia N fraction and flow, and the target copies of *S. bovis*. Treatment LY decreased ( $P < 0.05$ ) the slope of pH drop, the area under pH 6.0, and the gas production, and tended ( $P < 0.10$ ) to increase the minutes until minimum pH, but only with BA diet. These results suggest potential benefits of LY in stabilizing the fermentation of barley-based diets.

**Keywords:** Fermentation, rumen pH, *Saccharomyces cerevisiae*, cereal.

## INTRODUCTION

Feedlot cattle are often fed diets comprised of a high proportion of grain in order to maximize animal performance, providing large amounts of non-structural carbohydrates (NSC) in the rumen. These NSC, and especially starch, have different rates and extent of fermentation in the rumen depending on the feedstuff where they come from (Offner et al., 2003). Thus, between barley and corn, both widely used in beef cattle diets, barley starch has greater rate and extent of ruminal degradation than corn starch (Herreriasaldana et al., 1990; Nocek and Tamminga, 1991). This difference affects rumen fermentation patterns (Chamberlain et al., 1985; Orskov, 1986), and in the case of an abrupt increase in grain supply, rapidly fermentable carbohydrates may favour the appearance of digestive disorders such as acidosis (Owens et al., 1998).

There is extensive research on the effects of live yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) as a feed additive for ruminants. Modes of action identified are the supply of growth factors to rumen microorganisms, oxygen scavenging inducing more favorable conditions for the anaerobic communities, and nutritional competition with autochthonous ruminal species (Fonty and Chaucheyras-Durand, 2006). Main effects attributed to yeast are the stimulation of cellulolytic and lactate-utilizing bacteria *in vitro* (Nisbet and Martin, 1991; Chaucheyras et al., 1996; Newbold et al., 1998), increased fiber digestion (Williams et al., 1991; Carro et al., 1992b; Erasmus et al., 1992), and improved rumen pH (Lynch and Martin, 2002; Nocek et al., 2002; Bach et al., 2007). These effects suggest that yeast addition may help stabilize ruminal fermentation and may be beneficial for feedlot cattle fed high-grain diets.

The objective of the experiment was to evaluate the effects of type of cereal (corn vs barley) and live yeast on rumen fermentation profile and microbial population, using a dual-flow continuous culture rumen fermentation system. We hypothesized that the inclusion of live yeast would improve the rumen fermentation profile of high grain diets, especially when the starch of the ration was highly fermentable.

## **MATERIAL AND METHODS**

### ***Apparatus and experimental design***

Eight 1320-mL dual-flow continuous culture fermenters (Hoover et al., 1976) were used in the experiment, designed as a 2 x 2 factorial. Main factors were live yeast (no yeast (**NY**) vs  $2 \times 10^7$  CFU of yeast/g of diet (**LY**) (*S. cerevisiae* CNCM I-1077, Levucell<sup>®</sup> SC, Lallemand SAS, Blagnac, France) and type of predominant cereal in the diet (corn, **CO** vs barley, **BA**). The experiment was conducted in two replicated periods, resulting four replicates per treatment.

Two different diets were formulated for CO and BA treatments (Table 1). The CO diet contained mostly corn grain (low degradable starch), and the BA diet contained mostly barley grain (rapidly degradable starch). Moreover, the CO diet included soy hulls and soybean meal in order to reduce differences on nitrogen and fiber content compared with BA. However, the different nature of barley and corn grains led to differences on final chemical composition among treatments, which will be considered later in the discussion of the effects of type of cereal. Both CO and BA diets had a 10:90 fescue-hay to concentrate ratio and were formulated to meet or exceed NRC (1996) requirements for beef heifers. Feed was offered in 3 equal portions daily (0000, 0800 and 1600 h) for a total of 80 g DM/d.

Fermenters were inoculated with a composited rumen fluid from two beef heifers fed a 10:90 forage to concentrate diet. Fermenters were maintained at 38.5° C, and the pH was allowed to fluctuate. However, an upper limit of 6.6 and a lower limit of 5.5 was set and controlled by computer through infusions of 3 M HCl or 5 M NaOH, in order to prevent extreme pH fluctuations. Liquid and solid dilution rates were set at 0.12 h<sup>-1</sup> and 0.06 h<sup>-1</sup>, respectively. Anaerobic conditions were maintained by infusion of N<sub>2</sub> at a rate of 40 mL/min. Artificial saliva (Weller and Pilgrim, 1974) was continuously infused into flasks and contained 0.4 g of urea/L to simulate recycled N. Fermentation parameters were monitored and controlled by a computer and a programmed linear controller with LabView Software (FieldPoint, National Instruments, Austin, TX).

### ***Sampling***

Each experimental period consisted of 6 d for adaptation and 3 d for sampling. During these sampling days the pH was recorded automatically by the

computer every 60 s. Minimum and maximum pH limits were set at 5.5 and 6.6 to avoid extreme pH fluctuations. However, the pH drop after feeding was larger than expected and pH limits were reached daily. Data of pH after feeding, while it was not automatically controlled, were used to assess the severity of ruminal pH drop post-feeding, by calculating the time until pH reached its minimum value, and the area under pH 6.0 during the first 60 min post-feeding. Samples of the liquid fraction were collected 1.5 h after feeding, for VFA and N fraction analyses (peptides, AA and ammonia). Additional samples of complete fermenter effluent were taken at 1000 h, 2 h after feeding, to determine 16s rRNA gene copies of *Streptococcus bovis* and *Megasphaera elsdenii* by quantitative PCR. All samples were frozen at -20° C until analyses.

During sampling days, liquid and solid effluents were collected in individual plastic vessels, separately for each fermenter, and maintained at 4° C to stop microbial action. Every 24 h, liquid and solid effluents within fermenter were mixed for 1 min, and a 500-mL sample was taken and frozen at -20° C. At the end of each period, effluents from the 3 d of sampling were thawed, mixed within fermenter for 2 min, and a subsample was lyophilized to determine OM, aNDF and CP digestibility. In addition, bacteria were isolated from fermenter flasks on the last day of each period. One hundred milliliters of a 20 mL/L methylcellulose solution and small beads (30 of 2 mm diameter and 15 of 4 mm diameter) were added to each fermenter, incubated in the same fermenter flask at 39° C for 1 h to remove attached bacteria, and refrigerated at 4° C for 24 h. After refrigeration, fermenter contents were agitated for 1 h to dislodge loosely attached bacteria, and filtered through 2 layers of cheesecloth, keeping the supernatant. The resulting solid fraction was washed with saline solution, homogenized for 1 min to dislodge solid-phase bacteria, and strained through two layers of cheesecloth, keeping again the supernatant. Bacterial cells were isolated from this supernatant within 4 h by differential centrifugation at 1000 × g for 15 min to eliminate feed particles, and at 10,000 × g for 15 min to isolate the bacterial pellet. Pellets were rinsed twice with saline solution and centrifuged again at 10,000 × g for 15 min. The last rinse was done with distilled water to prevent artificially increasing ash content of bacteria due to residual NaCl from the saline solution. Bacterial pellets obtained were frozen at -20° C until analyses. Bacterial cells were lyophilized and analyzed for DM, ash, N, and purine

contents to determine the efficiency of microbial protein synthesis, N fraction flow (dietary and microbial), and CP degradation.

*In vitro gas production test.* In order to complete the data obtained from fermenters, an *in vitro* gas production test was conducted the last day of the first period as described by Theodorou et al. (1994). The inoculum was composed of an equal (vol/vol) composite of the liquid fraction from fermenters with the same treatment, standardized at pH 6.5 by infusions of 3 M HCl or 5 M NaOH, and infused with CO<sub>2</sub> at 38° C for 10-15 min to remove the O<sub>2</sub> in the overhead space. The substrate of fermentation was 0.5 g of the same 10:90 forage to concentrate diet fed to fermenters. Additional incubations without substrate were used as blank. The incubation bottles (150 mL serum flasks) were filled with 75 mL of the fermenter content, hermetically pressured-closed and introduced into a constant-temperature (38.5° C) waterbath for 24 h. Four replicates per treatment were used to measure gas production. Gas pressure in each bottle was measured at 0, 1, 2, 3, 4, 5, 8, 12, and 24 h. Bottles were manually shaken for 3 s after each measure of gas pressure.

### ***Chemical analyses***

The DM content of effluent and bacterial samples were determined by lyophilizing 300 and 50-mL aliquots, respectively, in triplicate with subsequent drying at 100° C in a forced-air oven for 24 h (AOAC, 1990). Diet DM was determined at 100°C in a forced-air oven for 24 h. Dry samples were ashed overnight at 500° C in a muffle furnace. Fiber components of diets and effluents were analyzed by the detergent system (Van Soest et al., 1991) adding sulfite and a thermostable  $\alpha$ -amylase (Mertens, 2002). Effluent and bacterial cells were analyzed for purine content by HPLC (Balcells et al., 1992). Samples for VFA were prepared as described by Jouany (1982) using 4-methylvaleric acid as internal standard. The analysis was performed by GLC (model 6890, Hewlett Packard, Palo Alto, CA) using a polyethylene glycol TPA-treated capillary column (BP21, SGE, Europe Ltd., UK). For ammonia-N determinations, a 4-mL subsample of filtered fluid was acidified with 4 mL of 0.2 N HCl, and then centrifuged at 15,000 × g for 15 min and the supernatant was analyzed for ammonia-N as described by Chaney and Marbach (1962). Peptide and AA-N were determined as described by Winter et al. (1964). A 16-mL sample of fermenter fluid was added to 4 mL of 10 mg/L sodium tungstate and 4 mL of 0.54 M

sulfuric acid. After allowing the tubes to stand at 5° C for 4 h, they were centrifuged at 9,000 × g for 15 min. The supernatant was frozen until analyzed for tungstic acid (TA) precipitable N by the Kjeldahl procedure (AOAC, 1990). To determine trichloroacetic acid (TCA) precipitable N, 4 mL of 50 mg/L TCA was added to 16 mL of fermenter fluid. After 4 h at 5° C, tubes were centrifuged at 9,000 × g for 15 min. The supernatant was frozen until analyzed for TCA soluble N. Results were used to calculate in mg/100 mL: 1) Peptide N = (TCA N) – (TA N); and 2) AA N = (TA N) – (ammonia N).

The qPCR samples were composited for each fermenter within period, resulting in 4 replicates per treatment. The extraction of DNA and the qPCR were done as described by Blanch et al.(2010). Results were converted from ng DNA/mL of sample to number of copies/mL of sample (Talbot et al., 2008). For the statistical analysis of the qPCR results, data were transformed by logarithm transformation to obtain a normal distribution.

### **Statistical Analyses**

All statistical analyses were conducted using the MIXED procedure of SAS (version 9.1, SAS Institute, Inc., Cary, NC) with factorial arrangement of treatments, where main factors were live yeast addition and type of predominant cereal in the diet. The model included type of cereal, yeast addition, and its interaction as fixed effects. Results of OM and fiber digestion, N flow, and qPCR were analyzed with period and fermenter as random effects. Results of VFA profile and N fractions during sampling days were analyzed considering fermenter as the subject for repeated measures over the days, with the Compound Symmetry covariance structure, and day nested within period as random effect. The pH data also were analyzed considering fermenter as the subject for repeated measures over the meal hours, with a first-order Antedependence covariance structure, and period, fermenter, and its interaction as random effects.

The statistical analysis of results of gas production from the *in vitro* gas production test included the hour, the type of cereal, the yeast addition, and its interaction as fixed effects, considering the flask as the subject for repeated measures over the hours, with a first-order Antedependence covariance structure.

For all the statistical analyses, significance was declared at  $P < 0.05$  and trends at  $0.05 \leq P < 0.10$ , using the Tukey (1953) multiple comparison test to separate means.

## RESULTS

### *Fermentation profile*

There were no interactions between type of cereal and yeast addition on fermentation profile. Therefore, results of main factors are shown separately.

*Type of cereal.* Fermenters fed the BA diet had greater ( $P = 0.02$ ) OM true digestion, and lower ( $P < 0.01$ ) aNDF digestion than those fed the CO diet (Table 2). The BA diet reduced propionate proportion ( $P = 0.03$ ) and branched chain VFA concentration ( $P < 0.01$ ), and increased ( $P < 0.01$ ) valerate proportion, compared with the CO diet. The BA diet increased ( $P < 0.01$ ) peptides and ammonia N fractions (Table 3), while decreased ( $P = 0.01$ ) AA fraction compared with the CO diet. The BA diet increased ammonia N flow ( $P < 0.01$ ) and CP degradation ( $P = 0.03$ ), and decreased ( $P = 0.01$ ) non-ammonia N flow, specifically by decreasing ( $P = 0.01$ ) dietary N flow, compared with the CO diet. The logarithm of target copies of *M. elsdenii* was greater ( $P < 0.01$ ) in the BA diet as compared with the CO diet (Table 4).

*Yeast addition.* The LY treatment increased ( $P < 0.01$ ) branched chain VFA (Table 2), and reduced ( $P = 0.01$ ) ammonia N fraction and flow (Table 3) compared with the NY treatment. The logarithm of target copies of *S. bovis* was lower ( $P < 0.01$ ) in LY than in the NY treatment.

### *pH of the rumen fluid*

After feed was offered, and while pH was not automatically controlled by the minimum and maximum pH limits, there was a trend ( $P = 0.07$ ) for a cereal  $\times$  yeast interaction in time until minimum pH, where LY increased it only in the BA diet (Table 5). There was a cereal  $\times$  yeast interaction where LY reduced the area under pH 6.0 ( $P < 0.01$ ) and the slope of pH drop ( $P = 0.03$ ) only in the BA diet. The amount of 3 M HCl needed to maintain the maximum pH limit at 6.6 was greater ( $P < 0.01$ ) in fermenters fed the BA diet than those fed the CO diet (Table 5). In addition, the LY treatment tended ( $P = 0.09$ ) to reduce the amount of HCl needed, compared with NY. Similarly, the amount of 5 M NaOH needed to

maintain the minimum pH limit at 5.5 was greater ( $P = 0.01$ ) in the BA diet compared with the CO diet.

### ***Gas production***

The BA diet increased ( $P < 0.01$ ) gas production over the entire gas production test compared with the CO diet (Figure 1). Therefore, after 24 h of incubation the BA diet produced 297.9 mL vs 183.2 mL produced with CO ( $P < 0.01$ ; SEM = 6.27). The LY treatment tended ( $P = 0.08$ ) to decrease gas production over the *in vitro* test compared with NY (162.8 vs 179.2 mL, respectively, SEM = 6.12). In addition, there was an interaction cereal  $\times$  yeast  $\times$  hour ( $P = 0.01$ ), where the effect of LY on the reduction of the gas production was greater with BA diet in the first 5 hours of incubation (Figure 1).

## **DISCUSSION**

### ***Effects of type of cereal on fermentation profile***

The formulation of the CO diet originally included soy hulls and soybean meal in order to reduce differences on nitrogen and fiber content compared with the BA diet. However, the different nature of barley and corn grains led to have differences on final chemical composition that must be considered in the discussion of the effects of type of cereal. Therefore, the greater OM digestion of BA diet was likely caused by the greater degradability of barley starch compared with corn starch (Offner et al., 2003), but also could be consequence of the greater NSC content of BA diet compared with CO. Others have also shown an increase of OM truly digested in barley vs corn based diets (McCarthy et al., 1989; Overton et al., 1995), but not always (Boss and Bowman, 1996). The BA diet had lower aNDF digestion than CO, likely as a consequence of a lower pH, since previous *in vitro* and *in vivo* studies indicated that cellulose digestion can be severely inhibited by even modest declines in ruminal pH (Russell and Wilson, 1996). However, the greater aNDF digestion with CO could also be related to the inclusion of soy hulls in the diet, which represents a source of highly digestible fiber (Mansfield et al., 1994).

Differences in the VFA profile feeding CO or BA were similar to those reported previously either in heifers or cows fed barley vs corn based diets (Overton et al., 1995; Surber and Bowman, 1998). Orskov et al. (1986) also



found a reduction in propionate proportion when sheep were fed barley vs corn based diets, while Boss and Bowman (1996) observed an increase in valerate and a reduction of iso-butyrate proportions.

Fermenters fed the BA diet had a greater CP degradation than those fed the CO diet. This effect was expected due to the greater degradability of barley protein compared with corn protein (NRC, 1996), and justifies the greater ammonia-N flow and the lower dietary-N flow of BA compared with CO. Boss and Bowman (1996) showed similar results in ammonia and dietary N flow, while others (Surber and Bowman, 1998) did not shown differences between barley and corn diets in N flow. Regarding N fractions, the greater CP degradation with BA is also reflected in greater peptide and ammonia concentrations compared with CO. However, the AA fraction concentration (the intermediate step in protein catabolism between peptides and ammonia) was lower in BA than in CO. There is no clear explanation for that as multiple factors are involved in the accumulation of the N fractions. This lower AA fraction concentration could be due to either a reduction in the peptidase activity or an increase in the deaminase activity.

Diets with rapidly degradable starch stimulate growth rate of all microbes and, typically, it has been associated with an overgrowth of starch-fermenting and lactate-producing bacteria, such as *S. bovis* (Russell and Rychlik, 2001). According to this, although as a small trend, we found an increase of number of copies of the 16s ribosomal gene of *S. bovis* with BA compared with CO. On the other hand, the relationship between increased availability of fermentable carbohydrate and an increase in the bacterial population involved in lactate utilization is not well defined (Nagaraja and Titgemeyer, 2006). In our study, the number of copies of the *M. elsdenii* gene was higher with BA than with CO diet, and may be attributed to the higher NSC content and the faster degradability of BA starch, suggesting that *M. elsdenii* population could have higher lactate availability as a substrate for growth. Unfortunately, the lactate concentration was not measured so we can not assess more accurately the relation between NFC degradation, lactate concentration and the presence of the lactate-utilizing bacteria.

### ***Effects of yeast addition on fermentation profile***

The LY treatment resulted in a greater branched chain VFA (BCVFA) concentration. The BCVFA are growth factors for some cellulolytic bacteria in pure culture conditions (Bryant and Doetsch, 1955; Gorosito et al., 1985), and some authors (Chademana and Offer, 1990b; Wallace and Newbold, 1992) have suggested that the increase of fibrolytic bacteria population is central to the action of yeast. In this trial, LY reduced the 16s gene copy numbers of *Streptococcus bovis*, suggesting potential benefits on prevention of the overgrowth of this amylolytic bacteria. Previous in vitro studies (Chaucheyras et al., 1996; Chaucheyras-Durand et al., 2005) also found that live yeast cells were able to reduce *S. bovis* population by competing for nutrients utilization.

The addition of LY reduced both the ammonia-N fraction and flow, which would suggest positive effects on reducing ammonia emissions in vivo. Others also found a reduction of ammonia-N with yeast addition in vivo (Newbold et al., 1990; Chademana and Offer, 1990) and in vitro (Carro et al., 1992). Chaucheyras-Durand et al. (2005) suggested that live yeast is able to limit growth and activities of proteolytic bacteria, avoiding accumulation of ammonia in the rumen.

### ***Drop of pH after feeding***

The drop of pH after feeding was larger than expected and minimum and maximum pH limits were reached daily, altering the normal pH fluctuation. Thus, the slope of pH drop and the area under pH 6.0 were calculated within the first 60 min after feed was offered, because during this time pH was not automatically controlled, in order to assess the severity of pH drop post-feeding. When LY was added to BA, it tended to increase the time until pH reached its minimum value, reducing the slope of pH drop, the area under pH 6.0, and the amount of HCl needed to stabilize pH, suggesting that LY addition was more effective in stabilizing ruminal pH with the BA diet. These results must be interpreted with caution because not all the pH fluctuation data were analyzed, but yeast addition seems to be a useful tool to stabilize pH against an abrupt post-feeding fall in pH, likely related with the lower *S. bovis* DNA found after the addition of LY. It would be interesting to study the implications of this result under *in vivo* conditions, and its relationship with the incidence of digestive disease such as acidosis. Higher pH values with live yeast addition is consistent with some

(Williams et al., 1991; Lynch and Martin, 2002; Bach et al., 2007), but not all reports (Carro et al., 1992a; Erasmus et al., 1992; Lila et al., 2004).

As expected, the BA diet had a greater area under the curve of pH 6.0, and needed greater amounts of NaOH and HCl to maintain the pH within the pre-established limits, compared with CO. This effect is attributable to the higher content and degradability of NSC of BA diet. Others have shown similar effects when comparing barley vs a corn based diet *in vivo* (Overton et al., 1995; Boss and Bowman, 1996; Surber and Bowman, 1998).

### ***Gas production***

Measuring the gas production with our dual flow continuous culture fermenter system is not possible, so an additional *in vitro* gas production test was needed. The increased gas production with BA diet is consistent with the increase of OM truly digested observed in fermenters, and can be explained by the higher content and fermentability of starch in the BA, compared with CO diet. The LY addition tended to decrease the gas production over the entire *in vitro* test, but especially during the first five hours of fermentation with the BA diet (Figure 1). These results suggest that LY addition reduced the fermentation of the substrate, preventing especially the rapid fermentation and gas accumulation in the BA diet. This is consistent with the slower pH drop after feeding and the lower *S. bovis* DNA, as previously mentioned, and suggests a potential effect of LY on reducing the risk of digestive disorders, such as acidosis or bloat, on beef heifers. Further research is warranted to investigate the effect of LY on rumen fermentation *in vivo* under dietary challenging conditions.

### **CONCLUSIONS**

The effects of the type of cereal were expected. Within the conditions of this trial, the addition of LY reduced ammonia-N concentration in both diets and stabilized ruminal pH in the barley based diet, suggesting potential benefits of LY reducing the risk of developing digestive diseases in beef heifers.

**REFERENCE LIST**

- AOAC. 1990. Official Methods of Analysis. 15th ed. Assoc. Off. Anal. Chem., Arlington, VA.
- Bach, A., C. Iglesias, and M. Devant. 2007. Daily rumen pH pattern of loose-housed dairy cattle as affected by feeding pattern and live yeast supplementation. *Anim. Feed Sci. Technol.* 136:146-153.
- Balcells, J., J. A. Guada, J. M. Peiro, and D. S. Parker. 1992. Simultaneous determination of allantoin and oxypurines in biological fluids by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.* 575:153-157.
- Blanch, M., S. Calsamiglia, M. Devant, and A. Bach. 2010. Effects of acarbose on ruminal fermentation, blood metabolites and microbial profile involved in ruminal acidosis in lactating cows fed a high-carbohydrate ration. *J. Dairy Res.* 77:123-128.
- Boss, D. L. and J. G. P. Bowman. 1996. Barley varieties for finishing steers 2: Ruminal characteristics and rate, site, and extent of digestion. *J. Anim. Sci.* 74:1973-1981.
- Bryant, M. P. and R. N. Doetsch. 1955. Factors necessary for the growth of bacteroides-succinogenes in the volatile acid fraction of rumen fluid. *J. Dairy Sci.* 38:340-350.
- Carro, M. D., P. Lebzien, and K. Rohr. 1992a. Effects of yeast culture on rumen fermentation, digestibility and duodenal flow in dairy cows fed a silage based diet. *Livest. Prod. Sci.* 32:219-229.
- Carro, M. D., P. Lebzien, and K. Rohr. 1992b. Influence of yeast culture on the in vitro fermentation (Rusitec) of diets containing variable portions of concentrates. *Anim. Feed Sci. Technol.* 37:209-220.
- Chademana, I. and N. W. Offer. 1990. The effect of dietary inclusion of yeast culture on digestion in the sheep. *Anim. Prod.* 50:483-489.
- Chamberlain, D. G., P. C. Thomas, W. Wilson, C. J. Newbold, and J. C. Macdonald. 1985. The effects of carbohydrate supplements on ruminal concentrations of ammonia in animals given diets of grass-silage. *J. Agric. Sci.* 104:331-340.
- Chaney, A. L. and E. P. Marbach. 1962. Modified reagents for determination of urea and ammonia. *Clin. Chem.* 8:130-132.
- Chaucheyras, F., G. Fonty, G. Bertin, J. M. Salmon, and P. Gouet. 1996. Effects of a strain of *Saccharomyces cerevisiae* (Levucell SC1), a microbial additive for ruminants, on lactate metabolism in vitro. *Can. J. Microbiol.* 42:927-933.
- Chaucheyras-Durand, F., S. Masségli, G. Fonty. 2005. Effects of the microbial feed additive *Saccharomyces cerevisiae* CNCM I-1077 on protein and peptide degrading activities of rumen bacteria grown in vitro. *Curr. Microbiol.* 50:96-101.
- Chaucheyras-Durand, F., Walker, N. and Bach, A. 2008. Effects of active dry yeasts on the rumen microbial ecosystem: Past, present and future. *Anim. Feed Sci. Technol.* 145:5-26.
- Erasmus, L. J., P. M. Botha, and A. Kistner. 1992. Effect of yeast culture supplement on production, rumen fermentation, and duodenal nitrogen flow in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 75:3056-3065.

- Fonty, G. and F. Chaucheyras-Durand. 2006. Effects and modes of action of live yeasts in the rumen. *Biologia* 61:741-750.
- Gorosito, A. R., J. B. Russell, and P. J. Vansoest. 1985. Effect of carbon-4 and carbon-5 volatile fatty acids on digestion of plant-cell wall in vitro. *J. Dairy Sci.* 68:840-847.
- Herrera-Saldana, R. E., J. T. Huber, and M. H. Poore. 1990. Dry matter, crude protein, and starch degradability of 5 cereal-grains. *J. Dairy Sci.* 73:2386-2393.
- Hoover, W. H., B. A. Crooker, and C. J. Sniffen. 1976. Effects of differential solid-liquid removal rates on protozoa numbers in continuous cultures of rumen contents. *J. Anim. Sci.* 43:528-534.
- Jouany, J. P. 1982. Volatile fatty acids and alcohol determination in digestive contents, silage juice, bacterial cultures and anaerobic fermenter contents. *Sci. Aliments* 2:131-144.
- Lila, Z. A., N. Mohammed, T. Yasui, Y. Kurokawa, S. Kanda, and H. Itabashi. 2004. Effects of a twin strain of *Saccharomyces cerevisiae* live cells on mixed ruminal microorganism fermentation in vitro. *J. Anim. Sci.* 82:1847-1854.
- Lynch, H. A. and S. A. Martin. 2002. Effects of *Saccharomyces cerevisiae* culture and *Saccharomyces cerevisiae* live cells on in vitro mixed ruminal microorganism fermentation. *J. Dairy Sci.* 85:2603-2608.
- Mansfield, H. R., M. I. Endres, and M. D. Stern. 1994. Influence of non-fibrous carbohydrate and degradable intake protein on fermentation by ruminal microorganisms in continuous culture. *J. Anim. Sci.* 72:2464-2474.
- Mertens, D.R., 2002. Gravimetric determination of amylase-treated neutral detergent fibre in feeds with refluxing beakers or crucibles: collaborative study. *J. Assoc. Off. Assoc. Chem. Int.* 85, 1217–1240.
- McCarthy, R. D., T. H. Klusmeyer, J. L. Vicini, J. H. Clark, and D. R. Nelson. 1989. Effects of source of protein and carbohydrate on ruminal fermentation and passage of nutrients to the small-intestine of lactating cows. *J. Dairy Sci.* 72:2002-2016.
- Mosoni, P., Chaucheyras-Durand, F., Béra-Maillet, C. and Forano, E. 2007. Quantification by real-time PCR of cellulolytic bacteria in the rumen of sheep after supplementation of a forage diet with readily fermentable carbohydrates: effect of a yeast additive. *J. Appl. Microbiol.* 103: 2676–2685
- Nagaraja, T. G. and E. C. Titgemeyer. 2006. Ruminal acidosis in beef cattle: The current microbiological outlook. *J. Anim. Sci.* 84:153.
- Newbold, C. J., F. M. McIntosh, and R. J. Wallace. 1998. Changes in the microbial population of a rumen-simulating fermenter in response to yeast culture. *Can. J. Anim. Sci.* 78:241-244.
- Newbold, C. J., P. E. Williams, N. McKain, A. Walker, and R. J. Wallace. 1990. The effects of yeast culture on yeast numbers and fermentation in the rumen of sheep. *Proc. Nutr. Soc.* 49-46A.
- Nisbet, D. J. and S. A. Martin. 1991. Effect of a *Saccharomyces cerevisiae* culture on lactate utilization by the ruminal bacterium *Selenomonas ruminantium*. *J. Anim. Sci.* 69:4628-4633.

- Nocek, J. E., W. P. Kautz, J. A. Z. Leedle, and J. G. Allman. 2002. Ruminant supplementation of direct-fed microbials on diurnal pH variation and in situ digestion in dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 85:429-433.
- Nocek, J. E. and S. Tamminga. 1991. Site of digestion of starch in the gastrointestinal tract of dairy cows and its effect on milk yield and composition. *J. Dairy Sci.* 74:3598-3629.
- NRC. 1996. Nutrient requirements of Beef Cattle. 7th ed. Natl. Acad. Press, Washington, DC.
- Offner, A., A. Bach, and D. Sauvant. 2003. Quantitative review of in situ starch degradation in the rumen. *Anim. Feed Sci. Technol.* 106:81-93.
- Orskov, E. R. 1986. Starch digestion and utilization in ruminants. *J. Anim. Sci.* 63:1624-1633.
- Overton, T. R., M. R. Cameron, J. P. Elliott, J. H. Clark, and D. R. Nelson. 1995. Ruminant fermentation and passage of nutrients to the duodenum of lactating cows fed mixtures of corn and barley. *J. Dairy Sci.* 78:1981-1998.
- Russell, J. B. and J. L. Rychlik. 2001. Factors that alter rumen microbial ecology. *Science* 292:1119-1122.
- Russell, J. B. and D. B. Wilson. 1996. Why are ruminal cellulolytic bacteria unable to digest cellulose at low pH? *J. Dairy Sci.* 79:1503-1509.
- Surber, L. M. M. and J. G. P. Bowman. 1998. Monensin effects on digestion of corn or barley high-concentrate diets. *J. Anim. Sci.* 76:1945-1954.
- Theodorou, M. K., B. A. Williams, M. S. Dhanoa, A. B. McAllan, and J. France. 1994. A simple gas-production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feeds. *Anim. Feed Sci. Technol.* 48:185-197.
- Tukey, J. W. 1953. Some selected quick and easy methods of statistical analysis. *Trans. N. Y Acad. Sci.* 16:88-97.
- 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.
- Wallace, R. J. and C. J. Newbold. 1992. Probiotics for ruminants. R. Fuller (Ed. ) *Probiotics: the scientific basis.* Chapman and Hall, London.317.
- Weller, R. A. and A. F. Pilgrim. 1974. Passage of protozoa and volatile fatty acids from rumen of sheep and from a continuous in vitro fermentation system. *Brit. J. Nutr.* 32:341-351.
- Williams, P. E., C. A. Tait, G. M. Innes, and C. J. Newbold. 1991. Effects of the inclusion of yeast culture (*Saccharomyces cerevisiae* plus growth medium) in the diet of dairy cows on milk yield and forage degradation and fermentation patterns in the rumen of steers. *J. Anim. Sci.* 69:3016-3026.
- Winter, K. A., R. R. Johnson, and B. A. Dehority. 1964. Metabolism of urea nitrogen by mixed cultures of rumen bacteria grown on cellulose. *J. Dairy Sci.* 47:793-797.

## FIGURES AND TABLES

**Table 1.** Ingredient and chemical composition of the barley and corn diets.

	Barley (BA)	Corn (CO)
Ingredients, g/kg DM		
Corn	-	552
Soy hulls	-	267
Soybean meal	-	77.7
Barley	892	-
Fescue	97.8	97.2
Minerals	9.0	5.1
Urea	9	1.0
Chemical analysis		
Dry Matter, g/kg FM	897	881
Ashes, g/kg DM	56	42
CP, g/kg DM	161	172
aNDF, g/kg DM	160	228
NSC, g/kg DM	603	528

**Table 2.** Effect of type of cereal and yeast addition on nutrients digestibility and fermentation profile of ruminal liquid in continuous culture.

Item	<i>Cereal</i> <sup>1</sup>		<i>Yeast</i> <sup>2</sup>		SEM	<i>P-Value</i>	
	CO	BA	NY	LY		Cereal	Yeast
OM true digestion rate	0.42	0.47	0.44	0.45	0.015	0.02	0.56
aNDF digestion rate	0.43	0.09	0.27	0.26	0.031	<0.01	0.71
Total VFA, mM	104.5	107.0	104.1	107.5	4.04	0.52	0.35
Individual VFA, mol/100 mol							
Acetate	50.9	49.2	49.2	51.0	2.22	0.46	0.40
Propionate	26.3	23.9	24.9	25.3	1.02	0.03	0.70
Butyrate	19.5	20.1	20.9	18.7	1.85	0.78	0.22
Valerate	2.00	6.20	4.26	3.95	0.583	<0.01	0.58
Branched chain VFA <sup>3</sup> , mM	1.41	0.53	0.82	1.12	0.126	<0.01	0.02
Acetate:Propionate	1.96	2.13	2.01	2.07	0.145	0.25	0.68

<sup>1</sup> Type of cereal in the diet (corn, CO vs barley, BA).

<sup>2</sup> Yeast addition (no yeast, NY, vs  $2 \times 10^7$  CFU of yeast/g of diet, LY).

<sup>3</sup> Branched chain VFA includes Isobutyrate and Isovalerate VFA.



**Table 3.** Effects of type of cereal and yeast addition on N metabolism and flow of ruminal liquid in continuous culture.

Item	<i>Cereal</i> <sup>1</sup>		<i>Yeast</i> <sup>2</sup>		SEM	<i>P-Value</i>	
	CO	BA	NY	LY		Cereal	Yeast
N fractions, mg/100mL							
Peptides	5.21	8.69	6.69	7.21	0.650	<0.01	0.23
Amino-acids	1.69	0.45	0.83	1.30	0.33	0.01	0.21
Ammonia	0.83	5.29	3.50	2.62	0.213	<0.01	0.01
N flow, g/d							
Ammonia	0.03	0.20	0.13	0.10	0.008	<0.01	0.01
Nonammonia	2.58	2.45	2.51	2.52	0.031	0.01	0.58
Bacterial	0.71	0.83	0.74	0.79	0.059	0.11	0.37
Dietary	1.92	1.58	1.75	1.75	0.070	0.01	0.97
CP degradation rate	0.13	0.23	0.18	0.18	0.030	0.03	0.95
EMPS <sup>3</sup>	21.8	22.8	21.7	22.9	3.51	0.54	0.47

<sup>1</sup> Type of cereal in the diet (corn, CO vs barley, BA).

<sup>2</sup> Yeast addition (no yeast, NY, vs  $2 \times 10^7$  CFU of yeast/g of diet, LY).

<sup>3</sup> Efficiency of microbial protein synthesis (g N/kg OM truly digested).

**Table 4.** Effect of type of cereal and yeast addition on copies of 16S rRNA gene of *Streptococcus bovis* and *Megasphaera elsdenii* (logarithm of target copies/mL of ruminal fluid).

Item	<i>Cereal</i> <sup>1</sup>		<i>Yeast</i> <sup>2</sup>		SEM	<i>P-Value</i>	
	CO	BA	NY	LY		Cereal	Yeast
<i>M. elsdenii</i>	11.32	13.31	12.56	12.08	0.282	<0.01	0.17
<i>S. bovis</i>	10.79	11.49	11.52	10.75	0.272	0.12	0.06

<sup>1</sup> Type of cereal in the diet (corn, CO vs barley, BA).

<sup>2</sup> Yeast addition (no yeast, NY, vs  $2 \times 10^7$  CFU of yeast/g of diet, LY).

**Table 5.** Effect of type of cereal and yeast addition on pH drop after feeding, calculated until the minute in which pH reaches its minimum value.

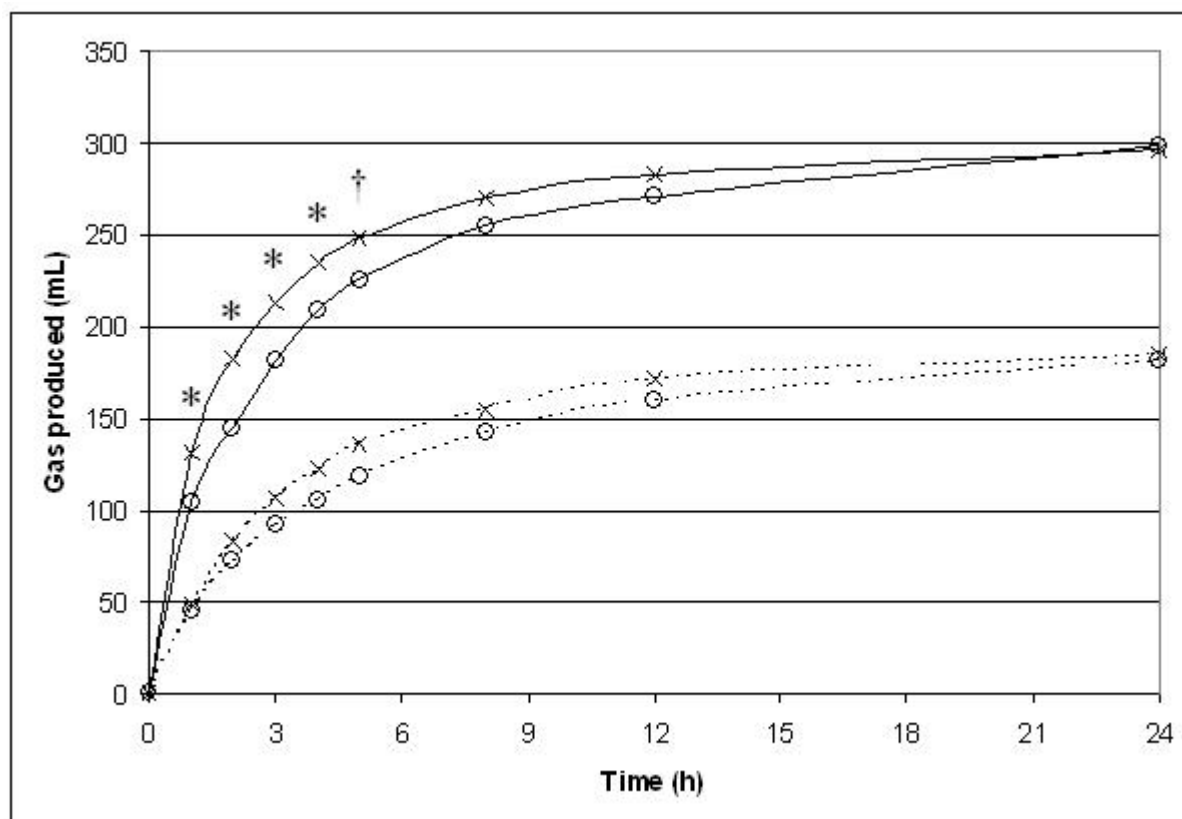
Item	<i>Treatment</i> <sup>1</sup>				SEM	<i>P-value</i>		
	BA+NY	BA+LY	CO+NY	CO+LY		Cereal	Yeast	Interaction
Time until minimum pH, min	76.5	116.2	119.5	120.7	10.02	0.04	0.06	0.07
Area under pH 6, h·pH/d <sup>2</sup>	5.29	1.75	0.46	1.18	0.521	<0.01	0.02	<0.01
Slope of pH drop <sup>2</sup>	-0.0469	-0.0358	-0.0179	-0.0176	0.0019	<0.01	0.03	0.03
3 M HCl, mL <sup>3</sup>	5.90	4.31	0.91	0.24	0.645	<0.01	0.09	0.48
5 M NaOH, mL <sup>3</sup>	2.02	2.33	0.02	0.59	0.650	0.01	0.45	0.82

<sup>1</sup> Treatment was type of cereal in the diet (corn, CO or barley, BA), and yeast addition (no yeast, NY; or  $2 \times 10^7$  CFU of yeast/g of diet, LY).

<sup>2</sup> Calculated with pH data of the first 60 min after feed was offered to fermenters.

<sup>3</sup> Amount of acid or base needed to maintain the pH within the 5.5 and 6.6 limits, between meals.

**Figure 1.** Effect of type of cereal and yeast addition on gas production (mL) *in vitro*.



Treatments were barley diet without yeast (BA+NY, —x—), barley diet with yeast (BA+LY, —o—), corn diet without yeast (CO+NY, .....x.....) and corn diet with yeast (CO+LY, .....o.....).

\* Values of the same diet are different due to a significant ( $P < 0.05$ ) effect of yeast addition.

† Values of the same diet are different due to a trend ( $P < 0.05$ ) for a yeast addition effect.



**CAPÍTULO IV**  
**Dietary challenge with yeast culture**

*Capítulo basado en el artículo publicado en Journal of Animal Science*



**Running head:** Dietary challenge with yeast culture.

**Effects of dietary changes and yeast culture (*Saccharomyces cerevisiae*)  
on rumen microbial fermentation of Holstein heifers<sup>1</sup>**

D. Moya\*, S. Calsamiglia\*<sup>1,2</sup>, A. Ferret\*, M. Blanch\*, J.I. Fandiño\*, L. Castillejos¶,  
and I. Yoon¶

\* Grup de Recerca en Nutrició, Maneig i Benestar Animal, Departament de Ciència Animal i dels Aliments, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193-Bellaterra, Spain.

¶ Diamond V Mills Inc., Cedar Rapids, IA.

<sup>1</sup> Financial support provided by Diamond V Mills, Inc.

<sup>2</sup> Corresponding author: sergio.calsamiglia@uab.cat



**ABSTRACT:** The effects of a dietary challenge to induce digestive upsets and supplementation with yeast culture on rumen microbial fermentation were studied using 12 Holstein heifers ( $277 \pm 28$  kg BW) fitted with ruminal cannula, in a crossover design with 2 periods of 5 wk. In each period, after 3 wk of adaptation to a 100% forage diet, the dietary challenge consisted of increasing the amount of grain at a rate of 2.5 kg/d (as-fed basis) over a period of 4 d, until a 10:90 forage:concentrate diet was reached, and then it was maintained for 10 d. Between periods, animals were fed again the 100% forage diet without any treatment for 1 wk as a wash-out period. Treatments started the first day of each period, and they were a control diet (CL) or the same diet with addition of yeast culture (YC, Diamond V XPCLS). Digestive upsets were determined by visual observation of bloat or by a reduction in feed intake (as-fed basis) of 50% or more compared with intake on the previous day. Feed intake was determined daily at 24-h intervals during the adaptation period and daily at 2, 6, and 12 h post-feeding during the dietary challenge. Ruminal liquid samples were collected daily during the dietary challenge to determine ruminal pH at 0, 3, 6, and 12 h post-feeding, and total and individual VFA, lactic acid, ammonia-N, and rumen fluid viscosity at 0 and 6 h post-feeding. The 16s rRNA gene copies of *Streptococcus bovis* and *Megasphaera elsdenii* were determined by quantitative PCR. Foam height and strength of the rumen fluid were also determined the day after the digestive upset to evaluate potential foam production. A total of 20 cases (83.3%) of digestive upsets were recorded in both periods during the dietary challenge, all diagnosed due to a reduction in feed intake. Rumen fermentation profile at 0 h on the digestive upset day was characterized by low ruminal pH, which remained under 6.0 for 18 h, accompanied by high total VFA concentration and, in some cases, by high lactate concentration. Addition of YC during the dietary challenge did not affect the incidence (10 cases per treatment) or time ( $7.00 \pm 0.62$  d) to digestive upset. However, YC reduced ( $P < 0.05$ ) the foam strength on the day after digestive upset, suggesting potential benefits of reducing the risk of developing bloat. The proposed dietary challenge model was successful in causing a digestive upset as indicated by reduced feed intake, but the YC addition had no significant impact on rumen fermentation.

**Keywords:** Heifer, Rumen Fermentation, Digestive Upset, Yeast Culture

## INTRODUCTION

Digestive disorders in feedlot cattle cause from 3 to 7% of total morbidity, and up to 25% of total mortality (Smith, 1998). The most critical moment is at feedlot arrival, when arriving animals are changed from a high forage to a high concentrate diet. If fermentable carbohydrate supply is increased abruptly, starch- and lactic acid-fermenting bacteria (such as *Streptococcus bovis*) respond by increasing growth rates and fermentative activities faster than lactic acid-utilizing bacteria (as *Megasphaera elsdenii*. Nagaraja and Titgemeyer, 2006). As a consequence, there is a non-physiological accumulation of VFA and lactate in the rumen resulting in lower ruminal pH and acidosis, which can range from acute (when there is lactic acid accumulation) to subacute (the presence of lactic acid is not consistent) (as *Megasphaera elsdenii*. Nagaraja and Titgemeyer, 2006). In addition, the overgrowth of some bacteria (mainly *S. bovis*) causes an excessive production of mucopolysaccharides, increasing the viscosity of the ruminal fluid and the risk of developing frothy bloat (Cheng et al., 1998). Previous research on digestive upsets in cattle shows that the response to a dietary challenge and its recovery depend, among others, on within-animal factors (Goad et al., 1998; Brown et al., 2006; Vasconcelos and Galvayan, 2008). However, response variables that could help predict individually the potential development of acidosis or bloat have not been examined simultaneously in a single study.

The use of yeast culture as a dietary supplement has been suggested as a useful tool to stabilize ruminal fermentation (Williams et al., 1991). Yeast culture products contain *Saccharomyces cerevisiae* fermentation metabolites (i.e., B vitamins, AA, organic acids) that work as stimulatory nutrients to specific fiber-digesting (Wiedmeier et al., 1987) and lactate-utilizing (Callaway and Martin, 1997) bacteria. Therefore, yeast culture addition in animals experiencing a dietary challenge with non-structural carbohydrates could enhance the *M. elsdenii* population preventing the negative effects of the overgrowth of starch-consuming bacteria (mainly *S. bovis*). This effect may help reduce the severity or expedite recovery from the digestive upset by avoiding the VFA and lactic acid accumulation in the rumen or the increase of ruminal fluid viscosity.

The objective of this study was to describe the changes occurring in the rumen during a digestive upset induced by rapidly changing from a high forage

diet to a high concentrate diet, and to evaluate the effects of yeast culture addition on rumen microbial fermentation during this dietary challenge in heifers.

## **MATERIALS AND METHODS**

### ***Animals***

Twelve Holstein heifers (initial BW of  $277 \pm 28$  kg), each fitted with a 1 cm i.d. plastic ruminal cannula (Divasa Farmavic SA, Vic, Spain), were individually housed in tie-stalls at the Servei de Granges i Camps Experimentals of the Universitat Autònoma de Barcelona, Spain. The ruminal fistulation was performed under local anesthesia and with full aseptic precautions 1 wk before the beginning of the experiment. The research protocol was approved by the Campus Laboratory Animal Care Committee of the Universitat Autònoma de Barcelona, Spain.

### ***Experimental design***

The experiment was performed using a crossover design with 6 heifers per treatment in each of the 2 periods. Each period consisted of 5 wk; the first 3 wk were used for adaptation to a 100% forage diet (a mixture of 80% fescue hay and 20% alfalfa pellets on as-fed basis) and treatments. After these 3 wk, heifers were progressively changed to a high concentrate diet over 4 d to induce a digestive upset by increasing grain at a rate of 2.5 kg/d (as-fed basis) and decreasing forage in the same proportion, until forage to concentrate ratio reached 10:90 (as-fed basis), and then the same diet was fed for 10 d. During these 2 wk, concentrate and straw was offered once a day (0900 h) in separate containers, and then removed from the feeders at 2100 h, causing a 12-h fast to promote rapid consumption of concentrate the following morning. Between periods, animals were fed again the 100% forage diet without any treatment during 1 wk as a wash-out period. After the first period, animals were assigned to the opposite treatment (crossover design) and the same protocol was repeated. The concentrate consisted of (DM basis) ground barley grain (32.2%), ground corn grain (27.9%), soybean meal (11.3%), soy hulls (8.1%), wheat (7.5%), corn gluten feed (7.2%), sunflower (2.8%), calcium soaps of fatty acids (1.1%), calcium carbonate (0.5%), sodium chloride (0.5%), dicalcium phosphate (0.5%), and vitamin supplement (0.4%). The diet was formulated to meet or exceed energy, CP, and mineral requirements of cattle (NRC, 1996). The

proportion of non-structural carbohydrates in the concentrate (54.3% DM) was intentionally high. Water was available for ad libitum consumption.

Treatments consisted of a control diet (CL) and the same diet containing 14 g/d of *Saccharomyces cerevisiae* based yeast culture (YC: Diamond V XPC<sub>LS</sub> Yeast Culture, Diamond V Mills Inc., Cedar Rapids, IA). Yeast culture treatment was offered at 0900 h daily from the first day of each period by mixing with 100 g of the concentrate used in the experiment which was offered separately from the daily ration to guarantee the consumption of the whole dose. Animals on the CL treatment received the same 100 g of concentrate without the addition of yeast culture.

Confirmation of digestive upset was determined by visual observation of bloat (Paisley and Horn, 1998) or by a reduction in feed intake of 50% or more compared with the intake of the previous day. Following the instructions of the Animal Care Committee, when digestive upset was observed, the affected animal was switched to a 100% forage diet with no yeast culture (wash-out period) on the following day and recovery was monitored.

### **Sample Collection and Analyse**

Dry matter intake was measured daily at 2, 6, and 12 h post-feeding during transition and high concentrate diet feeding. Dry matter intake was not measured during the wash-out period. Feed and orts were sampled daily and composited weekly. Dry matter content of feed and orts were determined from the composite samples by oven drying at 105°C for 24 h. Ruminal fluid was collected daily at 0 and 6 h after feeding during the transition and the challenge period, strained through 2 layers of cheesecloth, and 4 subsamples of the filtrate were frozen at -20°C for analyses of VFA, lactate, ammonia-N, viscosity, and quantitative real-time PCR (qPCR) to quantify the 16s rRNA gene copies of *Megasphaera elsdenii* and *Streptococcus bovis*. To determine pH (model 507, Crison Instruments SA, Barcelona, Spain), ruminal fluid samples were collected at 0, 3, 6, and 12 h after feeding. Only the samples collected on 3, 2, and 1 d before the digestive upset, the day of the digestive upset, and 1, 2, and 5 d after the digestive upset were analyzed. Additional samples of rumen fluid were collected the day after the digestive upset at 0 h to determine its foaming properties.

Lactate and VFA concentrations in ruminal fluid were analyzed using the gas chromatographic method described by Richardson et al. (1989) and Jensen et al. (1995), with the following modifications: to conserve the sample, 4 mL of ruminal fluid were added to a 1 mL solution of 1% (wt/wt) of mercuric chloride, 2% (vol/vol) orthophosphoric acid, and 0.2% (wt/wt) 4-methylvaleric acid as an internal standard in distilled water and frozen at -20°C. Samples were thawed and centrifuged at 15,000 x *g* for 15 min and diluted 1:1 in distilled water before performing VFA analysis. Ammonia-N concentration was analyzed by spectrophotometry (Libra S21, Biochrom Analytical Instruments, Cambridge, UK) as described by Chaney and Marbach (1962).

One extraction of DNA was done from each qPCR sample by physical disruption using a bead-beating method (Mini-Beater; Biospec Products, Bartlesville, OK) following the protocol described by Whitford et al. (1998) with the modifications proposed by Blanch et al. (2007). Briefly, rumen fluid (0.6 mL) was mixed with an equal volume of pH 8.0 buffered phenol solution (USB 75829, Cleveland, OH) in a 2-mL tube with 0.5 g of 0.1-mm glass beads (Biospec Products, Inc., Ref. 11079101, Bartlesville, OK). After adding 40 µL of 10% SDS (sodium dodecyl sulfate, Sigma L4522, St. Louis, MO), tubes were shaken 3 times for 2 min on a Mini-Beater, and then spun at 11,600 x *g* for 5 min in a microfuge. The aqueous phase was transferred to a new tube, extracted with buffered phenol and precipitated with ethanol. Samples were suspended in 100 µL of TE 0.5X buffer (TRIS-EDTA buffer, Sigma T9285, St. Louis, MO) and were treated with 2 µL RNase (10 mg/mL) for 1 h at 37°C (RNase A, Roche, Sant Cugat del Vallès, Barcelona), re-extracted with phenol, precipitated with ethanol and suspended in 50 to 200 µL of TE 0.5X. The DNA concentration was measured by spectrophotometry (NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer, Nanodrop Technologies, Wilmington, DE). The DNA obtained was stored at -20°C in aliquots of 20 ng/µL (stock). For the qPCR, specific primers and a probe for *S. bovis* were previously designed (Blanch et al., 2007) from 16S ribosomal RNA gene sequence available in the GeneBank database (AY442813) using the Primer Express Software (Applied Biosystems, Warrington, UK). The primers and probe sequences used were:

Forward primer *S. bovis* F: 5'-GATAGCTAATACCGCATAACAGCATT-3'

Reverse primer *S. bovis* R: 5'-AACGCAGGTCCATCTACTAGTGAA-3'

Probe *S. bovis* P: 5'-TGCTCCTTTCAAGCAT-3'.

For *M. elsdenii*, previously published primers specific for a 129 bp fragment of the 16S ribosomal RNA (Ouwerkerk et al., 2002) were chosen to accomplish specific amplification, while a specific Taqman MGB probe (Melsprobe: 5'-ACTGGTGTTCCCTCCTAATA-3') was designed with Primer Express Software (Blanch et al., 2007). All primers were purchased from Isogen Life Science, S.L. (Barcelona, Spain) and Taqman MGB probes from Applied Biosystems. The qPCR were run in triplicate for standard curve points, or in duplicate for the single extraction of each ruminal sample in a 20- $\mu$ L reaction volume containing 1x TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems), primers at a final concentration of 900 nM each, 250 nM probe, and 100 ng of genomic DNA (5  $\mu$ L of ruminal fluid samples at 20 ng/ $\mu$ L). The qPCR was run in the ABI PRISM 7900 HT Sequence Detection System (Applied Biosystems) using optical grade 96-well plates with the following amplification parameters; 2 min at 50°C, 10 min at 95°C, and 40 cycles for 15 s at 95°C and 1 min at 60°C. Reactions without DNA were used as negative control each time. The obtained measurements were converted from ng DNA/mL of sample to number of copies/mL of sample (Talbot et al., 2008). For the statistical analysis of the qPCR results, data were transformed by logarithm to obtain a normal distribution. The standard curve points were serial dilutions (1/10) from log 9.03 to log 15.03 of target copies/mL for *S. bovis*, and from log 7.85 to log 13.85 of target copies/mL for *M. elsdenii*. Whenever these probes resulted in no detection, a zero value was considered.

For determinations of the ruminal fluid viscosity, samples were thawed at ambient temperature, shaken and immediately analyzed with a low viscosity adaptor UL/Y (DV-E, Brookfield Engineering Laboratories, Middleboro, MA). Foam height and strength of rumen fluid were examined according to the procedure of Pressey et al. (1963) and Min et al. (2005). On the day after digestive upset, 50 mL of fresh rumen fluid of the affected heifer was collected before feeding. Ruminal fluid was poured into a glass cylinder (37 mm diameter x 30 cm length) and CO<sub>2</sub> gas was bubbled through a bottom inlet at 60 kPa for 30 s, resulting in conversion of most of the fluid into foam. Foam height, measured as the height of foam in the cylinder, was used as a measure of potential foam production. The time for the foam column to collapse on itself to the original fluid volume was used as an index of foam strength.

### **Statistical Analyses**

Data from the experiment were analyzed as a split-split plot using the MIXED procedure of SAS (version 9.1, SAS Institute, Inc., Cary, NC) for repeated measures when estimated R matrix is positive definite, considering heifer nested within treatment as the subject, with the Unstructured covariance structure for the hours and the Autoregressive covariance structure for days, according with the Bayesian information criterion. The model included the effects of treatment, day, hour, and all interactions, period and sequence as fixed factors, and the effects of heifer, heifer within period, and heifer within day within period as random factors.

The statistical analysis of the effect of YC on time to develop a digestive upset, and results from the foam height and strength test, were also analyzed using the MIXED procedure. The model contained the treatment effect as a fixed factor, whereas heifer and heifer within period were considered as random effects.

For all the statistical analyses, no effects were declared at  $P \geq 0.10$ , trends at  $0.05 \leq P < 0.10$ , and differences at  $P < 0.05$ , using a multiple comparison test (Tukey, 1953).

## **RESULTS AND DISCUSSION**

There were few interactions ( $P \geq 0.10$ ) between time (hour or day effects) and treatment effects. Therefore, main effects are discussed separately in 2 sections, unless otherwise indicated: 1) changes in ruminal fermentation during the dietary challenge, and 2) effects of yeast culture on ruminal fermentation during the dietary challenge.

### ***Changes in Ruminal Fermentation During the Dietary Challenge***

The dietary challenge model was successful in causing a total of 20 cases (83.3%) of digestive upsets in both periods: 11 of 12 heifers the in first period, and 9 of 12 heifers in the second period. Visual signs of bloat were not observed, thus all cases were diagnosed due to a 50% reduction in feed intake (Table 1). Reduction of feed intake is one of the main symptoms of digestive upset (Forbes and Barrio, 1992; Owens et al., 1998). For the purpose of this study, the 50% reduction in DMI was selected as an arbitrary but objective criterion. On average,

it took  $7.00 \pm 0.62$  d from the start of dietary challenge to develop the digestive upset according to our criteria. Generally, it is well accepted that the reduction in DMI after an abrupt inclusion of concentrate in the diet is due to an accumulation of fermentation acids, causing an increase in osmolality and the development of acidosis (Nocek, 1997; Owens et al., 1998; Krause and Oetzel, 2006). In our experiment, there were 4 of 24 cases (16.7%) with no signs of digestive upset after 14 d on the high concentrate diet. Some authors (Phy and Provenza, 1998; Dohme et al., 2008) suggest that ruminants might learn from previous acidotic experiences and consequently limit their subsequent intake of a high concentrate diet. However, we found that 3 of the 4 heifers that had a digestive upset in the first period became resistant in the second period, but 1 heifer that was resistant in the first period developed a digestive upset in the second period.

There was a day  $\times$  hour interaction ( $P < 0.01$ ) in ruminal pH, where it decreased ( $P < 0.05$ ) each day after feeding, except on the day of the digestive upset when pH increased ( $P < 0.01$ ) after feeding due to the reduction of feed intake previously mentioned (Table 1). The days before the digestive upset, the post-feeding reduction in pH was most likely due to the rapid fermentation of the high-concentrate diets together with the lower rumination and salivation normally associated with these type of diets (Emery and Brown, 1961; Balch, 1971). The 12 h of fasting helped recover the pH back to above 6.0 at 0 h the next day. However, on the digestive upset day pH at 0 h was lower ( $P < 0.05$ ) than the days around the upset at the same hour. Therefore, reduction in feed intake on the upset day was likely the consequence of the failure of recovery of ruminal pH, which was maintained under 6.0 for more than 18 h. Cerrato et al. (2006) indicated that the negative effects of low pH on rumen fermentation was a function of the total amount of time that pH was suboptimal, which may have caused ruminal acidosis and reduced feed intake (Owens et al., 1998). The recovery of pH after the digestive upset day is attributed to the change to a 100% forage diet.

There was a day  $\times$  hour interaction ( $P < 0.01$ ) for total VFA concentration, because it was greater ( $P < 0.05$ ) at 6 h post-feeding compared with 0 h on all days, except on the day of the digestive upset, when it was opposite, presumably due to the reduction in feed intake (Table 2). In addition, total VFA at 0 h was greater ( $P < 0.05$ ) the day of the digestive upset than 3 and 2 d before it, which could explain the lack of pH recovery previously described. On



the days after the digestive upset, total VFA concentration decreased as the diet was switched to a 100% forage diet. The hour  $\times$  day interaction was also detected ( $P < 0.01$ ) for the acetate to propionate ratio, which was lower ( $P < 0.05$ ) 6 h post-feeding than at 0 h all days, except for 1 and 2 d after the digestive upset, probably due to the change to a 100% forage diet. Lactate concentration was greater ( $P < 0.01$ ) at 0 and 6 h post-feeding the day of the digestive upset than the days around it, probably due to the extended period of rumen pH under 6.0 previously mentioned. However, not all heifers with digestive upset had the lactate spike. Lactate concentration was higher than 1.5 mM in 25% of the cases at 0 h, and 10% of the cases at 6 h, so most cases the digestive upset occurred even without lactate being present. These data agree with others (Owens et al., 1998), and has led to the suggestion that the role of lactic acid in the development of digestive upsets is overestimated, being the total acid load, and not lactate alone, responsible for acidosis (Britton and Stock, 1987). There was a day  $\times$  hour interaction ( $P < 0.01$ ) for ammonia-N concentration, because it was greater ( $P < 0.05$ ) at 6 h post-feeding compared with 0 h on days previous the digestive upset, but the opposite occurred after it. In addition, ammonia-N concentration was greater ( $P < 0.01$ ) the days previous to the digestive upset than the days after it. These effects were likely explained by the change of diet, because ammonia-N can be highly variable depending on the intake and the form of N available in the diets (Seal et al., 1992).

Copies of the 16s gene of *Streptococcus bovis* increased ( $P < 0.05$ ) on the digestive upset day compared with 3 d before it (Table 3). This increase could be related to the high lactate and total VFA concentration that occurred on the digestive upset day. Copies of 16s gene of *Megasphaera elsdenii* also tended to increase ( $P = 0.09$ ) in the digestive upset day compared with 3 d before it, as expected due to increased lactic acid supply. However, this increase did not avoid the lactic acid accumulation and the development of the digestive upset, suggesting that its role as lactic acid utilizer on the prevention of a digestive disease may be overemphasized. For this reason, further research on microbial population changes during a dietary challenge is necessary.

The overgrowth of some bacteria that release mucopolysaccharides (slime), such as *S. bovis*, contributes to the increase in the viscosity of ruminal fluid, favoring the development of bloat (Cheng et al., 1998). The ruminal fluid viscosity was greater ( $P < 0.01$ ) at 0 h than at 6 h post-feeding the days around

the digestive upset (Table 3), probably due to the differences in water intake, which should be greater post feeding (6 h) than after 12 h of fasting (0 h). Ruminal fluid viscosity was also greater ( $P < 0.05$ ) at 0 and 6 h on the day of the digestive upset compared with 3 and 2 d before. The increased viscosity of the ruminal fluid matched with the increased the copies of 16s rRNA gene of *S. bovis*, in agreement with Cheng et al. (1976). Because heifers were shifted to a 100% forage diet at the first symptom of upset, long-term effects of dietary challenge on the development of bloat were not observed. Once the heifers received a 100% forage diet after the digestive upset, the ruminal fluid viscosity decreased at 0 and 6 h post-feeding.

### ***Effects of Yeast Culture on Ruminal Fermentation During the Dietary Challenge***

The addition of YC did not affect the number of cases of digestive upsets after the dietary challenge (10 cases were recorded per treatment). The time to develop these digestive upsets after the change of diet was not affected ( $P = 0.20$ ) by YC (CL = 7.80 d; YC = 6.20 d; SEM = 0.85).

Average DMI (kg/d) of heifers during the transition until the digestive upset day was not affected ( $P = 0.32$ ) by treatment (Table 1). Others have shown that YC increased DMI during the transition from a pre-partum to a post-partum diet (Dann et al., 2000; Erasmus et al., 2005).

From 3 d before until 5 d after the digestive upset, mean ruminal pH was not affected ( $P = 0.99$ ) by YC addition (Table 1). The effects of YC on ruminal pH are highly variable depending on experimental conditions. Although some researchers have shown that YC maintains a more stable pH (Wiedmeier et al., 1987; Harrison et al., 1988; Callaway and Martin, 1997), others have reported no effects (Sullivan and Martin, 1999; Erasmus, 2005).

There was a treatment  $\times$  hour post-feeding interaction ( $P = 0.04$ ) in total VFA concentration, because it was lower at 0 h with YC, but the opposite was found at 6 h post-feeding (Table 2), suggesting a greater diet fermentability with YC. Therefore, the effects of YC on ruminal pH could be explained by the differences in total VFA concentration post-feeding, assuming a direct relationship between total VFA concentration and ruminal pH (Seymour et al., 2005). However, the potential increase in diet fermentability with YC did not affect the incidence or the time to cause the digestive upset. The effects of YC on

total VFA concentration have been inconsistent (Yoon and Stern, 1996; Callaway and Martin, 1997; Miller-Webster et al., 2002).

No effects of YC were found on other fermentative variables including acetate and propionate proportions as well as ammonia-N concentration (Table 2). Reported effects of YC on ruminal fermentation patterns are not consistent. For example, Harrison et al. (1988) found that YC reduced the acetate:propionate ratio by stimulating the proportion of propionate at the expense of acetate, whereas Robinson and Garrett (1999) reported the opposite. There was no effect ( $P = 0.48$ ) of YC on lactate concentration, in agreement with Sullivan and Martin (1999) and Lynch and Martin (2002). Callaway and Martin (1997) demonstrated that a sterilized filtrate of yeast culture stimulated growth of lactate utilizing ruminal bacteria like *M. elsdenii*. Under the present experimental conditions, YC tended to interact ( $P = 0.10$ ) with the hour post-feeding on copies of 16s rRNA gene of *S. bovis* (Table 3), because it was greater at 0 h than at 6 h post-feeding on CL animals (0 h = 11.58, 6 h = 11.41 logarithm of target copies/mL ruminal liquid), but the opposite occurred with YC (0 h = 11.89, 6 h = 11.94 logarithm of target copies/mL ruminal liquid). There is no clear hypothesis to justify these changes. For this reason, further in vivo microbiological studies would be needed to clarify the effects of YC on microbial population structure.

Frothy bloat in cattle is caused by the entrapment of gas in ruminal fluid (Mangan et al., 1959; Cheng et al., 1998). The ruminal fluid viscosity and the foam height and strength were analyzed to determine the potential implication of YC in the prevention of bloat. Addition of YC did not affect ( $P = 0.57$ ) the ruminal liquid viscosity (Table 3). However, YC reduced ( $P < 0.05$ ) the foam strength of the ruminal liquid (Table 4). Although symptoms of bloat were not observed in this study, the reduced foam strength of rumen fluid suggests the potential effect of YC on reducing the risk of bloat. Further research is warranted to investigate the effect of YC on rumen fermentation under dietary challenging conditions.

## **CONCLUSIONS**

Within the conditions of this study, the dietary challenge caused digestive upsets in 83% of the heifers after an average of 7 d. All cases were diagnosed by a reduction in feed intake. The determinant factor for this upset was a previous

period of low ruminal pH, accompanied by an increase in total VFA concentration and, in some cases, by an increase in lactate concentration. The addition of YC did not affect the incidence or the time to cause the digestive upset. However, YC reduced the foam strength, suggesting potential benefits in reducing the risk of developing bloat.

## REFERENCE LIST

- Balch, C. C. 1971. Proposal to use time spent chewing as an index of extent to which diets for ruminants possess physical property of fibrousness characteristic of roughages. *Br. J. Nutr.* 26:383-392.
- Blanch, M., S. Calsamiglia, and A. Castelló. 2007. Quantification of *Streptococcus bovis* and *Megasphaera elsdenii* in ruminal fluid of dairy cows and beef heifers by real time PCR technique. *J. Dairy Sci.* 90 (Suppl. 1):339. (Abstr.)
- Britton, R. A., and R. A. Stock. 1987. Acidosis, rate of starch digestion and intake. *Okl. Agric. Exp. Stn. MP-121:125-137.*
- Brown, M. S., C. H. Ponce, and R. Pulikanti. 2006. Adaptation of beef cattle to high-concentrate diets: Performance and ruminal metabolism. *J. Anim. Sci.* 84:25-33.
- Callaway, E. S. and S. A. Martin. 1997. Effects of a *Saccharomyces cerevisiae* culture on ruminal bacteria that utilize lactate and digest cellulose. *J. Dairy Sci.* 80:2035-2044.
- Cerrato, M., S. Calsamiglia, and A. Ferret. 2006. The negative effects of one cycle of eight hours at suboptimal pH on rumen fermentation are not reduced by splitting it into various cycles. *J. Anim. Sci.* 84:86-87.
- Chaney, A. L., and E. P. Marbach. 1962. Modified reagents for determination of urea and ammonia. *Clin. Chem.* 8:130-132.
- Cheng, K. J., R. Hironaka, G. A. Jones, T. Nicas, and J. W. Costerton. 1976. Frothy feedlot bloat in cattle: production of extracellular polysaccharides and development of viscosity in cultures of *Streptococcus bovis*. *Can. J. Microbiol.* 22:450-459.
- Cheng, K. J., T. A. McAllister, J. D. Popp, A. N. Hristov, Z. Mir, and H. T. Shin. 1998. A review of bloat in feedlot cattle. *J. Anim. Sci.* 76:299-308.
- Dann, H. M., J. K. Drackley, G. C. McCoy, M. F. Hutjens, and J. E. Garrett. 2000. Effects of yeast culture (*Saccharomyces cerevisiae*) on prepartum intake and postpartum intake and milk production of Jersey cows. *J. Dairy Sci.* 83:123-127.
- Dohme, F., T. J. DeVries, and K. A. Beauchemin. 2008. Repeated ruminal acidosis challenges in lactating dairy cows at high and low risk for developing acidosis: ruminal pH. *J. Dairy Sci.* 91:3554-3567.
- Emery, R. S., and L. D. Brown. 1961. Effect of feeding sodium and potassium bicarbonate on milk fat, rumen pH, and volatile fatty acid production. *J. Dairy Sci.* 44:1899-1902.

- Erasmus, L. J., P. H. Robinson, A. Ahmadi, R. Hinders, and J. E. Garrett. 2005. Influence of prepartum and postpartum supplementation of a yeast culture and monensin, or both, on ruminal fermentation and performance of multiparous dairy cows. *Anim. Feed Sci. Technol.* 122:219-239.
- Forbes, J. M., and J. P. Barrio. 1992. Abdominal chemo- and mechanosensitivity in ruminants and its role in the control of food intake. *Exp. Physiol.* 77:27-50.
- Fulton, W. R., T. J. Klopfenstein, and R. A. Britton. 1979. Adaptation to high concentrate diets by beef cattle. II. Effect of ruminal pH alteration on rumen fermentation and voluntary intake of wheat diets. *J. Anim. Sci.* 49:785-789.
- Goad, D. W., C. L. Goad, and T. G. Nagaraja. 1998. Ruminal microbial and fermentative changes associated with experimentally induced subacute acidosis in steers. *J. Anim. Sci.* 76:234-241.
- Harrison, G. A., R. W. Hemken, K. A. Dawson, R. J. Harmon, and K. B. Barker. 1988. Influence of addition of yeast culture supplement to diets of lactating cows on ruminal fermentation and microbial-populations. *J. Dairy Sci.* 71:2967-2975.
- Jensen, M. T., R. P. Cox, and B. B. Jensen. 1995. Microbial-production of skatole in the hind gut of pigs given different diets and its relation to skatole deposition in backfat. *Anim. Sci.* 61:293-304.
- Krause, K. M., and G. R. Oetzel. 2006. Understanding and preventing subacute ruminal acidosis in dairy herds: A review. *Anim. Feed Sci. Technol.* 126:215-236.
- Lynch, H. A., and S. A. Martin. 2002. Effects of *Saccharomyces cerevisiae* culture and *Saccharomyces cerevisiae* live cells on in vitro mixed ruminal microorganism fermentation. *J. Dairy Sci.* 85:2603-2608.
- Mangan, J. L. 1959. Bloat in cattle. *Proc. R. Soc. Med.* 52:376-379.
- Miller-Webster, T., W. H. Hoover, M. Holt, and J. E. Nocek. 2002. Influence of yeast culture on ruminal microbial metabolism in continuous culture. *J. Dairy Sci.* 85:2009-2014.
- Min, B. R., W. E. Pinchak, J. D. Fulford, and R. Puchala. 2005. Effect of feed additives on in vitro and in vivo rumen characteristics and frothy bloat dynamics in steers grazing wheat pasture. *Anim. Feed Sci. Technol.* 124:615-629.
- Nagaraja, T. G., and E. C. Titgemeyer. 2007. Ruminal acidosis in beef cattle: The current microbiological outlook. *J. Dairy Sci.* 90:17-38.
- Nocek, J. E. 1997. Bovine acidosis: implications on laminitis. *J. Dairy Sci.* 80:1005-1028.
- NRC. 1996. *Nutrient Requirements of Beef Cattle*. 7th ed. Natl. Acad. Press, Washington, DC.
- Ouwerkerk, D., A. V. Klieve, and R. J. Forster. 2002. Enumeration of *Megasphaera elsdenii* in rumen contents by real-time Taq nuclease assay. *J. Appl. Microbiol.* 92:753-758.
- Owens, F. N., D. S. Secrist, W. J. Hill, and D. R. Gill. 1998. Acidosis in cattle: a review. *J. Anim. Sci.* 76:275-286.

- Paisley, S. L., and G. W. Horn. 1998. Effect of ionophore on rumen characteristics, gas production, and occurrence of bloat in cattle grazing winter wheat pasture. Oklahoma State Univ., Anim. Sci. Res. Rep.141-146.
- Phy, T. S., and F. D. Provenza. 1998. Eating barley too frequently or in excess decreases lambs' preference for barley but sodium bicarbonate and lasalocid attenuate the response. J. Anim. Sci. 76:1578-1583.
- Pressey, R., R. S. Allen, J. Bertram, S. H. Synhorst, and N. L. Jacobson. 1963. Foaming properties of alfalfa and their relationship to bloat. J. Anim. Sci. 22:970-978.
- Richardson, A. J., A. G. Calder, C. S. Stewart, and A. Smith. 1989. Simultaneous determination of volatile and non-volatile acidic fermentation products of anaerobes by capillary gas-chromatography. Lett. Appl. Microbiol. 9:5-8.
- Robinson, P. H., and J. E. Garrett. 1999. Effect of yeast culture (*Saccharomyces cerevisiae*) on adaptation of cows to postpartum diets and on lactational performance. J. Anim. Sci. 77:988-999.
- Seal, C. J., D. S. Parker, and P. J. Avery. 1992. The effect of forage based and forage-concentrate based diets on rumen fermentation and metabolism of nutrients by the mesenteric- and portal-drained viscera in growing steers. Br. J. Nutr. 67:355-370.
- Seymour, W. M., D. R. Campbell, and Z. B. Johnson. 2005. Relationships between rumen volatile fatty acid concentrations and milk production in dairy cows: a literature study. Anim. Feed Sci. Technol. 119:155-169.
- Smith, R. A. 1998. Impact of disease on feedlot performance: a review. J. Anim. Sci. 76:272-274.
- Sullivan, H. M., and S. A. Martin. 1999. Effects of a *Saccharomyces cerevisiae* culture on in vitro mixed ruminal microorganism fermentation. J. Dairy Sci. 82:2011-2016.
- Talbot, G., E. Topp, M. F. Palin, and D. I. Masse. 2008. Evaluation of molecular methods used for establishing the interactions and functions of microorganisms in anaerobic bioreactors. Water Res. 42:513-537.
- Tukey, J. W. 1953. Some selected quick and easy methods of statistical analysis. Trans. N. Y. Acad. Sci. 16:88-97.
- Vasconcelos, J. T., and M. L. Galvayan. 2008. ASAS Centennial Paper: Contributions in the Journal of Animal Science to understanding cattle metabolic and digestive disorders. J. Anim. Sci. 86:1711-1721.
- Whitford, M. F., R. J. Forster, C. E. Beard, J. Gong, and R. M. Teather. 1998. Phylogenetic analysis of rumen bacteria by comparative sequence analysis of cloned 16S rRNA genes. Anaerobe. 4:153-163.
- Wiedmeier, R. D., M. J. Arambel, and J. L. Walters. 1987. Effect of yeast culture and *Aspergillus oryzae* fermentation extract on ruminal characteristics and nutrient digestibility. J. Dairy Sci. 70:2063-2068.
- Yoon, I. K., and M. D. Stern. 1996. Effects of *Saccharomyces cerevisiae* and *Aspergillus oryzae* cultures on ruminal fermentation in dairy cows. J. Dairy Sci. 79:411-417.

## TABLES

**Table 1.** Cumulative DMI (kg) and ruminal liquid pH of animals experiencing a digestive upset (n = 20) on or around the day it appeared (0 d)

Item	Day							Treatment		SEM	<i>P</i> -value <sup>1</sup>				
	-3 d	-2 d	-1 d	0 d	1 d	2 d	5 d	CL	YC		H	D	H×D	T	H×T
DMI															
2 h	3.05 <sup>c,x</sup>	2.96 <sup>c,x</sup>	2.47 <sup>c,x</sup>	0.52 <sup>c,y</sup>	- <sup>2</sup>	-	-	1.97	2.55	0.30	<0.01	<0.01	<0.01	0.32	0.67
6 h	4.82 <sup>b,x</sup>	4.99 <sup>b,x</sup>	4.83 <sup>b,x</sup>	1.09 <sup>b,y</sup>	-	-	-	3.66	4.19						
12 h	7.00 <sup>a,x</sup>	7.38 <sup>a,x</sup>	7.18 <sup>a,x</sup>	2.28 <sup>a,y</sup>	-	-	-	5.87	6.04						
Ruminal pH															
0 h	6.67 <sup>a,y</sup>	6.54 <sup>a,y</sup>	6.47 <sup>a,y</sup>	5.95 <sup>b,z</sup>	7.01 <sup>a,x</sup>	7.01 <sup>a,x</sup>	7.02 <sup>a,x</sup>	6.61	6.72	0.054	<0.01	<0.01	<0.01	0.99	0.12
3 h	6.10 <sup>b,z</sup>	6.11 <sup>b,z</sup>	6.10 <sup>b,z</sup>	6.24 <sup>a,z</sup>	6.48 <sup>b,y</sup>	6.68 <sup>b,x</sup>	6.45 <sup>b,y</sup>	6.34	6.28						
6 h	5.93 <sup>c,z</sup>	5.86 <sup>c,z</sup>	5.76 <sup>c,z</sup>	6.33 <sup>a,y</sup>	6.40 <sup>bc,xy</sup>	6.54 <sup>c,x</sup>	6.45 <sup>b,xy</sup>	6.21	6.15						
12 h	5.62 <sup>d,z</sup>	5.61 <sup>d,z</sup>	5.47 <sup>d,z</sup>	6.06 <sup>b,y</sup>	6.30 <sup>c,x</sup>	6.28 <sup>d,x</sup>	6.20 <sup>c,xy</sup>	5.93	5.94						

<sup>1</sup> Fixed effects were hour post-feeding (H), day (D), hour within day (H×D), treatment (T), hour within treatment (H×T), and other non-significant ( $P > 0.10$ ) effects, including period, sequence, day within treatment, and hour within day within treatment.

<sup>2</sup> Not determined.

<sup>a, b, c, d</sup> Means with different superscripts in the same column are different ( $P < 0.05$ ).

<sup>x, y, z</sup> Means with different superscripts in the same row are different ( $P < 0.05$ ).

**Table 2.** Total VFA concentration (mM), acetate to propionate ratio, and lactate (mM) and ammonia-N (mg/100 mL) concentrations of animals experiencing a digestive upset (n = 20) on or around the day it appeared (0 d)

Item	Day							Treatment			P-value <sup>1</sup>				
	-3 d	-2 d	-1 d	0 d	1 d	2 d	5 d	CL	YC	SEM	H	D	H×D	T	H×T
Total VFA															
0 h	107.3 <sup>b,x</sup>	111.3 <sup>b,x</sup>	117.6 <sup>b,wx</sup>	125.0 <sup>a,w</sup>	76.3 <sup>b,z</sup>	75.9 <sup>b,z</sup>	89.6 <sup>b,y</sup>	102.1	98.0	4.67	<0.01	<0.01	<0.01	0.96	0.04
6 h	127.4 <sup>a,w</sup>	130.8 <sup>a,w</sup>	131.3 <sup>a,w</sup>	94.3 <sup>b,xy</sup>	91.6 <sup>a,xy</sup>	87.6 <sup>a,y</sup>	100.2 <sup>a,x</sup>	106.5	110.9						
Acetate:propionate															
0 h	3.97 <sup>a,w</sup>	3.87 <sup>a,w</sup>	3.90 <sup>a,w</sup>	4.46 <sup>a,w</sup>	2.78 <sup>x</sup>	2.69 <sup>b,x</sup>	3.97 <sup>w</sup>	3.62	3.71	0.22	<0.01	<0.01	<0.01	0.81	0.56
6 h	3.29 <sup>b,xy</sup>	3.23 <sup>b,xy</sup>	3.29 <sup>b,xy</sup>	3.57 <sup>b,wx</sup>	2.83 <sup>y</sup>	3.07 <sup>a,xy</sup>	3.85 <sup>w</sup>	3.30	3.32						
Lactate															
0 h	0.99 <sup>x</sup>	1.01 <sup>x</sup>	1.21 <sup>x</sup>	10.3 <sup>a,w</sup>	1.06 <sup>x</sup>	0.89 <sup>x</sup>	0.96 <sup>x</sup>	2.01	2.61	1.43	0.15	<0.01	<0.01	0.48	0.50
6 h	1.07 <sup>x</sup>	1.20 <sup>x</sup>	1.19 <sup>x</sup>	5.34 <sup>b,w</sup>	1.16 <sup>x</sup>	1.10 <sup>x</sup>	1.03 <sup>x</sup>	1.12	2.28						
Ammonia-N															
0 h	8.45 <sup>b,xy</sup>	9.21 <sup>b,x</sup>	8.40 <sup>b,xy</sup>	13.0 <sup>a,w</sup>	6.12 <sup>yz</sup>	5.22 <sup>z</sup>	7.76 <sup>a,xy</sup>	8.67	7.84	1.11	0.76	<0.01	<0.01	0.54	0.80
6 h	13.6 <sup>a,w</sup>	13.3 <sup>a,w</sup>	10.7 <sup>a,wx</sup>	9.85 <sup>b,x</sup>	4.33 <sup>y</sup>	3.35 <sup>y</sup>	4.85 <sup>b,y</sup>	8.71	8.28						

<sup>1</sup> Fixed effects were hour post-feeding (H), day (D), hour within day (H×D), treatment (T), hour within treatment (H×T), and other non-significant ( $P > 0.10$ ) effects, including period, sequence, day within treatment, and hour within day within treatment.

<sup>a, b, c</sup> Means with different superscripts in the same column are different ( $P < 0.05$ ).

<sup>w, x, y, z</sup> Means with different superscripts in the same row are different ( $P < 0.05$ ).



**Table 3.** Copies of 16S rRNA gene of *Streptococcus bovis* and *Megasphaera elsdenii* (logarithm of target copies/mL of ruminal fluid; each sample was run in duplicate, n = 20) and ruminal fluid viscosity (centipoises, n = 20 ) of animals experiencing a digestive upset on or around the day it appeared (0 d)

Item	Day							Treatment			P-value <sup>1</sup>				
	-3 d	-2 d	-1 d	0 d	1 d	2 d	5 d	CL	YC	SEM	H	D	H×D	T	H×T
<i>S. bovis</i>	11.5 <sup>y</sup>	- <sup>2</sup>	-	11.9 <sup>x</sup>	-	-	-	11.5	11.9	0.29	0.38	0.05	0.99	0.22	0.10
<i>M. elsdenii</i>	3.07	-	-	4.75	-	-	-	4.36	3.45	1.01	0.77	0.09	0.70	0.56	0.94
Viscosity															
0 h	7.29 <sup>a,x</sup>	7.95 <sup>a,x</sup>	8.53 <sup>a,wx</sup>	10.3 <sup>a,w</sup>	6.56 <sup>a,x</sup>	4.11 <sup>a,xy</sup>	3.84 <sup>a,y</sup>	7.17	6.71	0.56	<0.01	<0.01	0.09	0.57	0.44
6 h	3.90 <sup>b,xy</sup>	4.49 <sup>b,x</sup>	4.79 <sup>b,x</sup>	6.61 <sup>b,w</sup>	2.66 <sup>b,yz</sup>	2.12 <sup>b,z</sup>	1.99 <sup>b,z</sup>	3.82	3.76						

<sup>1</sup> Fixed effects were hour post-feeding (H), day (D), hour within day (H×D), treatment (T), hour within treatment (H×T), and other non-significant ( $P > 0.10$ ) effects, including period, sequence, day within treatment and hour within day within treatment.

<sup>2</sup> Not determined.

<sup>a, b</sup> Means with different superscripts in the same column are different ( $P < 0.05$ ).

<sup>w, x, y, z</sup> Means with different superscripts in the same row are different ( $P < 0.05$ ).

**Table 4.** Foam height and strength of ruminal fluid from animals experiencing a digestive upset

Item	Treatment <sup>1</sup>		SEM	P-value
	CL	YC		
Foam height, cm	17.8	16.6	1.9	0.54
Foam strength, min	32.3	12.1	5.9	0.02

<sup>1</sup> Treatments were the ruminal fluid from heifers with yeast culture addition (YC, n = 10) and from control animals (CL, n = 10), collected on the day after digestive upset before feeding.



## **CAPÍTULO V**

### **Free choice diets for beef cattle**

*Capítulo basado en el artículo aceptado en Journal of Animal Science*



**Running head: Free choice diets for beef cattle**

**Feeding behavior and ruminal acidosis in beef cattle offered a total mixed ration or dietary components separately<sup>1</sup>**

D. Moya<sup>\*</sup>, A. Mazzenga<sup>‡</sup>, L. Holtshausen<sup>¶</sup>, G. Cozzi<sup>‡</sup>, L.A. González<sup>¶</sup>, S. Calsamiglia<sup>\*</sup>, D.G. Gibb<sup>¶</sup>, T.A. McAllister<sup>¶</sup>, K.A. Beauchemin<sup>¶</sup> and K. Schwartzkopf-Genswein<sup>¶,2</sup>

<sup>\*</sup> Departament de Ciència Animal i dels Aliments, Universitat Autònoma de Barcelona, Spain; <sup>‡</sup> Department of Animal Science, University of Padova, Italy; and <sup>¶</sup> Agriculture and Agri-Food Canada Research Centre, Lethbridge, Alberta, Canada

<sup>1</sup> Financial support provided by Agriculture and Agri-Food Canada.

<sup>2</sup> Corresponding author: karen.genswein@agr.gc.ca

**ABSTRACT:** Eighty continental crossbred beef heifers ( $414.9 \pm 37.9$  kg BW), 16 of which were ruminally cannulated, were used in a 52-d experiment with a generalized randomized block design, to assess if self-selection of dietary ingredients modulates ruminal pH and improves rumen function of feedlot finishing cattle. Treatments were: total mixed ration (TMR) (85% barley-grain (BG), 10% corn silage (CS), 5% supplement); or free-choice (i.e., self-selection) (FC) diets of barley-grain and corn silage (BGCS); barley grain and wheat distillers' grain (BGDG); or corn silage and wheat distillers' grain (CSDG). Heifers were housed in groups of 10 in 8 pens equipped with the GrowSafe System enabling feed intake and feeding behaviour to be continuously monitored. Two cannulated heifers were randomly assigned to each pen and equipped with indwelling pH probes for continuous measurement of ruminal pH during 4 periods (1 to 4 d, 7 to 14 d, 21 to 28 d, and 42 to 49 d). Rumen fluid samples were collected from cannulated heifers 2 h post feed delivery on d 4 and 49, for determination of VFA. Heifers fed TMR had shorter ( $P = 0.01$ ), and smaller ( $P = 0.03$ ) meals than those fed FC diets. Cattle fed BGCS and BGDG increased ( $P < 0.01$ ) intake of BG over time by up to 80 and 70%, respectively. Increased consumption of BG arose from an increase ( $P < 0.01$ ) eating rate over the same ( $P > 0.10$ ) feeding time, which was accompanied by an increase ( $P < 0.05$ ) in eating rate but a decrease ( $P < 0.05$ ) in feeding time of either CS or DG. Even with increased BG consumption, ruminal pH and VFA profiles were not different ( $P > 0.10$ ) among FC diets or compared with TMR. Cattle fed FC CSDG consumed DG at a level of 60 % of dietary DM over the trial, resulting in higher ( $P < 0.05$ ) mean ruminal pH and acetate to propionate ratio, and lower ( $P < 0.05$ ) area under the curve, than those given the other FC diets or the TMR. Finishing feedlot cattle fed FC diets containing BG self-regulate intake of diets that have a similar composition, intake level and ruminal fermentation profile to those fed a TMR.

**Keywords:** Beef cattle, acidosis, feeding behavior, free choice diets

## INTRODUCTION

Feedlot cattle are often fed total mixed rations (TMR) comprised of a high proportion of grain and minimal forage in order to maximize growth performance and profitability. Feedlot diets usually contain a base level of physically effective fiber to reduce the risk of subclinical ruminal acidosis and enhance rumen function. While pH in clinical ruminal acidosis is below 5.0, subclinical acidosis is characterized by prolonged bouts of ruminal pH between 5.0 and 5.5 (Nagaraja and Lechtenberg, 2007), arising mainly from the rapid production of VFA as a result of microbial fermentation of feed (Owens et al., 1998). The amount of fiber required to reduce subclinical acidosis depends on diet fermentability, as well as feeding behaviour, and rate of ruminal absorption of VFA in the host (Bevans et al., 2005). Previous studies with sodium bicarbonate reported that ruminants given free access to dietary ingredients select a diet that attenuates subclinical ruminal acidosis, although ruminal pH was not measured in those studies (Cooper et al., 1996; James and Kyriazakis, 2002; Phy and Provenza, 1998 a, b). Research that measured ruminal pH in relation to selection of dietary ingredients has not substantiated this claim (Keunen et al., 2003; Paton et al., 2006).

Distillers' grains (DG) are widely used in the diets of feedlot cattle (Klopfenstein et al., 2008). In western Canada, DG are available from either corn or wheat, with wheat DG having a higher protein, but lower fat content than corn DG (Ojowi et al., 1997; McKinnon et al., 1998; Shand et al., 1998). Although research on corn DG has been done in the United States (Vander Pol et al., 2005; Corrigan et al., 2009), there is little information on the risk of acidosis for finishing cattle fed diets containing wheat DG. A recent study showed that when wheat DG was used as a partial forage substitute, dairy cows spent less time chewing and had a higher risk of acidosis (Penner et al., 2009).

The study was conducted to determine if, when offered a choice of ingredients, feedlot cattle select a diet that modulates ruminal pH. The study focused on barley-grain, corn silage and wheat DG, which are common ingredients used in the diets of feedlot cattle in Western Canada.



## **MATERIALS AND METHODS**

### ***Experimental Design***

*Animals.* All animals were cared for in accordance to the Canadian Council of Animal Care guidelines (1997). Eighty continental crossbred beef heifers, with an initial BW of  $414.9 \pm 37.9$  kg, were used in a 52-d experiment at the Agriculture and Agri-Food Canada Research Centre in Lethbridge (AB, Canada). The experiment was conducted as a generalized randomized block design with 4 dietary treatments and 20 replications (heifers). One month prior to starting the study, cattle were ear tagged, fitted with a radio frequency transponder (Allflex USA Inc., Dallas Ft. Worth, TX, USA) in the left ear, and given a growth promotant implant (Component E-H, Elanco Animal Health, Guelph, ON, Canada). In addition, 16 out of the 80 heifers were ruminally cannulated (Model 9C, Bar Diamond, Parma, ID, USA) under local anesthesia using full aseptic precautions.

*Dietary treatments.* Treatments included (Table 1): 1) a TMR comprised mainly of barley- grain and corn silage as a control (TMR); 2) a free-choice (i.e., self-selection) diet (BGCS) providing cattle with separate access to dry-rolled barley-grain (BG) and corn silage (CS), 3) a free-choice diet (BGDG) of BG and pelleted wheat distillers' grain (DG) offered separately; or 4) a free-choice diet (CSDG) of CS and DG offered separately. The control TMR was typical of rations used in Western Canadian feedlots prior to the availability of DG. To ensure adequate vitamin and mineral consumption (NRC, 2000), a pelleted supplement was added to the TMR and all dietary components (i.e., BG, CS and DG), at a rate of 5% (DM basis). Melengesterol acetate (Pfizer, Kirkland, QC, Canada) was added to the supplement to suppress estrus. Furthermore, to ensure N intake was not a limiting factor, CS was blended with a small amount of wheat DG to increase its CP content to 12.9% (DM basis, Table 1).

All feeds were delivered at 0900 once daily, and were provided ad libitum assuring a 5-10% weight back. For free-choice diets, the location of each dietary ingredient within the pen was switched every 7 d throughout the experiment to eliminate the confounding effect of feed type and bunk location. Prior to starting the experiment all heifers were adapted to the TMR diet, with free-choice diets being available from d 1 to 52 of the study.

*Housing.* Animals were assigned, in groups of 10, to one of 8 pens ensuring uniformity in BW among pens. Pens measured 21 m × 27 m, with 15 m<sup>2</sup> of concrete in front of the feed bunk, and 12.6 m<sup>2</sup> of pen space available for each heifer. Cattle were provided with a continuous supply of fresh water and a bedded (whole barley straw) area away from the feed bunk. The amount of bedding added to the pens was recorded. In addition, visual observations were made (using video camera) over the first 21 d of the experiment, to verify whether the heifers consumed the bedding.

Each pen contained 2 feeding tubs equipped with an electronic monitoring system (GrowSafe Systems, Airdrie, AB, Canada) for automatic recording of feed intake and feeding behavior. Each tub measured 0.91 m × 0.53 m × 0.38 m, and allowed only 1 heifer to eat at a time. Tubs were mounted on 2 load cells, and had an antenna encased in the rim that recorded electromagnetic signals from ear transponders (Allflex Canada, St-Hyacinthe, Canada) with a range of approximately 0.5 m. A reader panel recorded individual transponder numbers, feed weight and the time of day, every 2 s over the experiment. The system was monitored daily to ensure it was functioning correctly. Each treatment was offered in 2 out of the 8 pens. The 16 cannulated heifers were assigned equally to the 8 pens (2 cannulated heifers per pen). All heifers were adapted to their feeding system for a minimum of 7 d prior to commencing the experiment.

### **Data Collection**

*Feed analysis and intake.* Samples of TMR, BG, DG, and CS were collected weekly for determination of DM. Values were used to calculate weekly composition of the diets offered on a DM basis. A subsample of each was stored and composited at 3-wk intervals for chemical analyses. Feed offered was recorded daily for each pen over the length of the experiment, while orts were removed, weighed and sampled weekly for DM determination. Therefore, DMI was determined weekly for each diet and pen as DM offered minus DM refused in order to ensure that the automatic monitoring system was functioning correctly. The feed and ort DM was determined by oven drying at 55°C for 48 h. All the analyses were performed on each sample in duplicate, and when the coefficient of variation was higher than 5 %, the analysis was repeated. The NDF and

ADF contents were determined by methods described by Van Soest et al. (1991), with amylase and sodium sulfite used in the NDF procedure. The concentration of CP ( $N \times 6.25$ ) in feed was quantified by flash combustion with gas chromatography and thermal conductivity detection (Carlo Erba Instruments, Milan, Italy).

*Feeding behaviour.* The electronic feed bunk monitoring system (GrowSafe Systems, Airdrie, AB, Canada) allowed the collection and storage of animal behavior data for the 80 heifers, 24 h/d from d 1 to 49 of the experiment. The distinct feeding events were pooled into meals as described by González et al. (2009). To pool feeding visits into meals, the meal criterion was calculated for each individual animal using the method of Yeates et al. (2001), defined as the longest non-feeding interval accepted (in minutes) as part of a meal. The meal criterion allowed the determination of meal frequency, as the number of times per day that a non-feeding interval length exceeded the meal criterion, the meal size (kg DM/meal), which was the average feed consumed per meal, and the meal duration and meal time, calculated as the sum of the length of all visits within a meal (min/meal) or within a day (min/d), respectively, including time out of the feeder within a meal. Frequency of visits was calculated as the number of feeding visits per day (No./d) and per meal (No./meal). Daily feeding time (min/d) was calculated as the time spent at the feeders within a day, without including the time in which heifers were absent from the feeders within a meal. Feeding rate was determined as daily DMI divided by daily feeding time (g DM/min). Additionally, total DMI and proportion of each component in the total DMI were calculated daily, as well as its day to day variability over the experiment, calculated as the standard deviation. All these calculations were determined for each animal using specially designed software developed in SAS (v. 9.1.3, SAS Int., NC).

*Weight gain.* Heifers were weighed 2 h prior to feed delivery at the beginning and at the end of the study. The ADG of each heifer was determined by dividing weight gain by the number of days on feed. Feed efficiency was calculated individually as gain to feed ratio (kg of weight gain divided by kg of DMI over the experiment).

*Ruminal pH.* Ruminal pH was continuously measured for 4 periods during the experiment (1 to 4 d, 7 to 14 d, 21 to 28 d, and 42 to 49 d)

using the wireless indwelling LRC pH system (Penner et al., 2006). The system consisted of a pH probe (model PHCN-37, Omega Engineering, Stamford, CT, USA) enclosed in a protective shield that allowed the ruminal liquid to percolate freely, but prevented the electrode from contacting the ruminal epithelium. Weights were attached to each probe to ensure that they remained in the ventral sac of the rumen. The indwelling electrode measured and recorded the ruminal pH every 60 s over the measurement period. Each electrode was standardized using pH 4.0 and 7.0 standards at the beginning and at the end of each session. The pH data were first summarized by day and then averaged across each measurement period as mean pH, maximum and minimum pH, and area under the curve and proportion of time in which pH was below 5.8, 5.5 and 5.2 as an index of severity of ruminal acidosis. The area under the curve was calculated by multiplying the absolute value of deviations in pH by the time in min spent below the established threshold for each measure, and was then divided by 60 and expressed as pH unit × h.

*VFA measurements.* Ruminal content samples were taken from cannulated animals on days 7 and 42 before feed delivery, and on days 4 and 49 of the experiment at 2 h after feed delivery. A composite sample of ruminal contents (250 mL per site) was obtained from the reticulum, the dorsal and ventral sacs, and the feed mat for each animal and was strained through polyester monofilament fabric (Pecap 7-335/47 mesh opening-335 µm, Tetko Inc., Scarborough, ON, Canada). For each heifer, 5 mL of filtrate was preserved for subsequent determination of VFA and lactate by adding 1 mL of 25% (wt/vol) metaphosphoric acid. Samples were stored at -20 °C in sealed plastic vials until analysis. Ruminal VFA were quantified using gas chromatography with crotonic acid as an internal standard (model 5890, Hewlett Packard, Little Falls, DE, USA) and a capillary column (30 m x 0.32 mm i.d., 1 µm phase thickness, bonded polyethylene glycol, Phenomenex Inc., Torrance, CA, USA) using flame ionization detection. Lactic acid concentration was determined by gas chromatography after derivatization with boron trifluoride-methanol as described by Supelco (1998).

*Blood variables.* Blood samples were taken from the cannulated heifers via jugular veinapuncture immediately prior to feed delivery on d 0, 7, 42 and 49 of the study. Blood was collected in 10 mL vacuum tubes containing

Na-heparin (Vacutainer No. 6480, Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA), and samples were analyzed within 2 h. Blood pH, partial pressure of CO<sub>2</sub> (pCO<sub>2</sub>), bicarbonate content, total content of CO<sub>2</sub> (equivalent to the content of bicarbonate plus carbonic acid) and the serum anion gap (the sum of free cations, Na<sup>+</sup> + K<sup>+</sup>, minus the sum of free anions, Cl<sup>-</sup> + HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>, in serum) were determined immediately using an electrolyte and blood gas analyzer (Vetstat, Idexx Laboratories, Westbrook, ME, USA). Packed cell volume (PCV) was determined using blood collected into a 7 mL vacuum tube containing EDTA (Vacutainer No. 6450, Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA). The blood was transferred to a micro-hematocrit capillary tube, the end was sealed, and the tube was centrifuged for 6 min with a hematocrit centrifuge and read with a microcapillary reader (model MH, International Equipment Co., Boston, MA, USA).

### ***Statistical Analyses***

Data were analyzed using the MIXED procedure of SAS (version 9.1, SAS Institute, Inc., Cary, NC) for repeated measures over time, considering heifer as the subject with the Univariate or the first-order Antedependence covariance structure, according to the lowest Bayesian information criterion. In addition, a set of 4 pens was used as the blocking factor. In the analysis of the feed intake, feeding behavior, feed cost of gain, pH profile, and blood and rumen fermentation variables, the model included treatment, time and their interactions as fixed effects, while the effect of the pen was considered as a random factor. The meal criterion, standard deviation of DMI, ADG and gain to feed ratio were calculated individually over the duration of the experiment, so the model included the treatment as a fixed effect and pen, and pen within treatment as random effects. For all the statistical analyses, significance was declared at  $P \leq 0.05$  and trends at  $0.05 < P < 0.10$ , using the Bonferroni multiple comparison test to separate means.

## **RESULTS**

Treatment differences were of more interest than time differences within a treatment. Therefore daily means within each treatment are not

presented, but treatment  $\times$  time interaction is just discussed where applicable.

### **Feed Intake and Behaviour**

A treatment  $\times$  time interaction ( $P < 0.01$ ) was observed for DMI, with all heifers increasing their DMI from wk 1 to wk 7, with the exception of those fed the BGDG in which DMI did not change during the experiment (Table 2). Heifers fed CSDG had greater DMI than those fed TMR ( $P = 0.04$ ) or BGCS ( $P < 0.01$ ) and heifers fed BGDG had greater DMI ( $P = 0.01$ ) than those fed BGCS. In addition, the day to day DMI variability over the experiment trended to be greater ( $P = 0.06$ ) in heifers fed CSDG than those fed the TMR treatment (CSDG = 2.53 vs. TMR = 1.98 kg DM/d; SEM = 0.094). A treatment  $\times$  time interaction ( $P < 0.01$ ) was observed for heifers fed free-choice diets (Figure 1), where cattle fed CSDG maintained the same consumption pattern over the experiment, but those offered the BGCS or BGDG treatments increased BG ( $P < 0.05$ ) as a proportion of DMI over time, and decreased ( $P < 0.05$ ) the proportion of DMI of either CS or DG, respectively.

The meal criterion was lower ( $P < 0.01$ ) in heifers fed TMR than those fed CSBG (TMR = 1007.1 vs. CSBG = 1793.0 s; SEM = 161.3). The meal size increased ( $P < 0.01$ ) over the experiment for all treatments, but it was lower ( $P = 0.03$ ) in heifers fed TMR than those fed BGDG or CSDG (Table 2). Daily feeding time showed a treatment  $\times$  time interaction ( $P < 0.01$ ), where heifers fed BGCS and BGDG decreased the time they spent feeding over the experiment, while heifers fed TMR and CSDG maintained the same feeding time over the course of the experiment. The feeding rate also showed a treatment  $\times$  time interaction ( $P = 0.01$ ), where all heifers increased their feeding rate over the experiment with the exception of those fed CSDG. The frequency of visits per day, like the frequency of visits per meal, showed a treatment  $\times$  time interaction ( $P < 0.01$ ). Heifers fed TMR and BGDG did not alter ( $P > 0.10$ ) the number of feeder visits over the experiment, while heifers fed BGCS and CSDG visited the feed bunk more frequently over the course of the study.

The analyses of feeding behavior on each dietary component separately showed the same trends and effects with the data sorted by

meal or by day; therefore, discussion regarding feeding behavior will be presented by day.

Regarding the feeding behavior of heifers offered CS as a dietary component, a treatment  $\times$  time interaction ( $P < 0.01$ ) was observed for all but a few calculated feeding behavior variables (Table 3). The proportion of CS consumed in the final diet was constant over the experiment when it was offered with DG, but decreased ( $P < 0.01$ ) when it was offered with BG (wk 1 = 24.4 vs. wk 7 = 16.9 % of total DMI; SEM = 1.99). The daily DMI of CS increased over the experiment when it was offered with DG, but remained constant when it was offered with BG. The daily feeding time remained constant over the experiment when CS was offered with DG, but decreased over the experiment with BG (wk 1 = 39.2 vs. wk 7 = 24.1 min/d; SEM = 5.30). The feeding rate showed a trend ( $P = 0.08$ ) for a treatment  $\times$  time interaction. Feeding rate was lower over the course of the experiment when CS was offered with DG, than when CS was offered with BG. The frequency of daily visits to the CS feeder had a greater increase over the study when CS was offered with DG (wk 1 = 14.7 vs. wk 7 = 20.3 visits/d; SEM = 1.04) than when it was offered with BG (wk 1 = 10.5 vs. wk 7 = 13.4 visits/d; SEM = 1.04).

When animals were offered free-choice treatments, the proportion of BG ingested showed a treatment  $\times$  time interaction ( $P = 0.01$ ), where BG intake increased over the experiment when it was offered with CS or DG (Figure 1). However, the variability of the proportion of BG consumed over the experiment was lower ( $P = 0.02$ ) when it was offered with CS than with DG (BGCS = 5.74 vs. BGDG = 8.33 kg BG/total DMI; SEM = 0.771). The daily DMI of BG ( $P = 0.01$ ) was greater when BG was offered with CS than with DG, and increased ( $P < 0.01$ ) over the experiment with CS or DG (Table 3).

The feeding behavior of heifers offered free-choice diets containing DG showed a treatment  $\times$  time interaction ( $P < 0.01$ ) for all the calculated parameters (Table 3). The proportion of DG chosen was constant over the experiment when it was offered with CS, but decreased with BG (wk 1 = 43.1 vs. wk 7 = 32.8 % of total DMI; SEM = 1.97. Figure 1). In addition, the variability of the proportion of DG ingested over the experiment was greater ( $P < 0.01$ ) when it was offered with BG than with CS (BGDG = 8.33

vs. CSDG = 4.88 kg DG/total DMI; SEM = 0.598). The daily DMI increased when it was offered with CS, but decreased when it was offered with BG. The daily feeding time decreased when DG was offered with BG (wk 1 = 41.2 vs. wk 7 = 23.2 min/d; SEM = 2.15), but remained constant with CS. The frequency of visits per day to the DG feeder increased when DG was offered with CS (wk 1 = 14.3 vs. wk 7 = 18.6 visits/d; SEM = 0.74), but remained constant with BG.

### ***Rumen Fermentation Profile***

Heifers fed CSDG exhibited a higher mean ruminal pH ( $P = 0.01$ ) than those fed the other diets, and a higher minimum pH ( $P = 0.01$ ) than those fed TMR or BGCS (Table 4). Heifers fed CSDG had lower ( $P < 0.05$ ) duration of ruminal pH under 5.8 and 5.5 than those fed the other diets. Similarly, cattle fed CSDG had a lower ( $P = 0.05$ ) area under curve at pH 5.8 than those fed the TMR or BGDG.

All the effects on VFA profile were found from sampling after feeding (Table 5). Heifers fed TMR had a greater total VFA concentration than those fed the other diets. In addition, total VFA concentration was lower ( $P = 0.01$ ) on d 4 than on d 49 of the experiment (107.3 vs 130.3 mM; SEM = 7.14). Animals fed CSDG had greater ( $P = 0.01$ ) proportions of acetate and butyrate and a lower ( $P < 0.01$ ) proportion of propionate than those fed the other diets. In addition, propionate was lower ( $P = 0.03$ ) on d 4 than on d 49 of the experiment (37.2 vs 39.5 mol/100 mol; SEM = 1.12). There was a trend for a treatment  $\times$  time interaction ( $P = 0.08$ ), where only heifers fed CSDG had a greater acetate to propionate ratio on d 4 compared with d 44. The branched-chain VFA showed a trend ( $P = 0.05$ ) for a treatment  $\times$  time interaction, where it only decreased in heifers fed CSDG from d 4 to d 49, but remained unchanged over the experiment for other diets. On average across all diets, the lactate concentration decreased ( $P < 0.01$ ) from 0.19 to 0.02 mM (SEM = 0.053) between d 4 and 49 of the experiment.

### ***Blood Variables***

There were no differences ( $P > 0.10$ ) among treatments in any of the blood variables measured (Table 6). The pCO<sub>2</sub> increased ( $P = 0.02$ ) from 38.7 to 44.3 kPa (SEM = 1.44) between d 0 and 49. Blood concentration of



Na<sup>+</sup> ( $P = 0.01$ ) and Cl<sup>-</sup> ( $P = 0.06$ ) were lower on d 7 as compared to the other days.

### ***Performance and Feed Cost***

The ADG was not different among feeding treatments (Table 7). However, heifers fed the CSDG treatment trended ( $P = 0.07$ ) to have a lower gain to feed ratio than those fed other treatments.

## **DISCUSSION**

### ***Feed Choice and Intake***

Cattle fed the free-choice treatments showed different preferences for each dietary component depending on the diet offered and, in some cases, changed their diet composition over the course of the experiment. These results suggest that ruminants allowed to choose among ingredients were able to select diets according to their needs, in agreement with previous studies (Forbes and Provenza, 2000; Atwood et al., 2001; Askar et al., 2006).

How ruminants regulate diet selection and food intake has been widely studied and reviewed (Gallouin and Le Magnen, 1987; Forbes, 1995; Illius et al., 2002), with work showing that multiple factors are involved in the control of voluntary intake (Forbes, 2003). These include post-ingestive feedback mechanisms (Yearsley et al., 2006), learning and feeding motivation (Day et al., 1998), energy balance and nutrient requirements (Stubbs and Tolkamp, 2006), fitness of the animal (Illius et al., 2002), and oxygen efficiency (Ketelaars and Tolkamp, 1996). In our study, when cattle were able to freely choose BG as a dietary component in combination with either CS or DG, they gradually increased the proportion of BG in their diet over the 52 d feeding period (Figure 1). This increase is interpreted as a natural and voluntary adaptation process to a high-concentrate diet, also reported in previous studies (Catanese et al., 2009), and linked to the animal's requirement for more energy for fat deposition with advancing maturity (NRC, 2000), as well as adaptation to the consumption of high-grain diets (Tajima et al., 2000; Sun et al., 2010).

Previous studies (Britton and Stock, 1987) have associated an erratic feed intake from day to day, reflected in increased variability of DMI, with metabolic digestive disorders such as subclinical acidosis. In our experiment, providing heifers a diet either as TMR or free-choice did not alter DMI variability, except for the CSDG treatment. However, the greater DMI variability with CSDG was not associated with ruminal acidosis, as heifers fed this treatment had the greatest ruminal pH values, but it was likely the result of an adaptation process to a diet with unusual high proportions of DG.

Cattle offered BG and CS initially consumed a diet consisting about 70% BG, but gradually increased the proportion of BG in the diet to 80% of total DMI, a level similar to the formulated TMR which contained about 85% BG. Previous research has also shown the ability of cattle to consume high proportions of grain given a free-choice diet (Sahin et al., 2003; Askar et al., 2006; González et al., 2009). However, other studies reported grain consumption below 60% of total DMI in animals offered free-choice diets (Catanese et al., 2009; Commun et al., 2009). These differences are most likely due to differences in animal and forage characteristics among experiments, such as the age of the animals or the physically effective fiber content of the forage.

When a choice of BG and DG was offered, without any forage, the proportion of BG ingested also increased over the experiment to 70%, but it did not reach the level of BG present either in the TMR or the CSBG diets. This difference in the BG proportion consumed between the BGCS and BGDG treatments may reflect the lower NDF content of DG (27.8 %) as compared to CS (42.2 %), and its smaller particle size. When used as a replacement for forage, wheat based distillers' grain does not stimulate the same degree of rumination and chewing (Penner et al., 2009), reducing the saliva production and, consequently, the capacity to neutralize the rapid acid production that arises from the fermentation of grain. Accordingly, the variability of the BG proportion in the diet was greater when it was offered with DG than with CS, indicating an erratic feed intake likely associated with a more acidotic rumen environment (Britton and Stock, 1987). Despite the lower intake of BG when it was offered with DG than with CS, heifers fed the BGDG treatment had a greater total DMI as they consumed 3.59 kg DM

of DG, compared with the 1.65 kg DM of CS consumed by the heifers offered BGCS. The larger particle size of CS compared with DG may in part account for the higher intake of DG compared with CS, due to its lower filling effect (Allen, 1996) and the faster passage rate from the reticulorumen (Jung and Allen, 1995). Other factors, such as fermentative products acting as a negative feedback to control feed intake are discussed later.

Distillers' grain was used as the main energy source of the diet for cattle offered CS and DG, comprising up to 63% of total DMI (Table 2). Even though DG and BG have approximately the same energy value, the proportion of DG consumed was lower than the proportion of BG consumed when they were offered with CS, suggesting that factors such as the fiber content or high N content as opposed to rumen fill may have limited DG consumption. In addition, the variability of the DG proportion in the diet was greater when it was offered with BG than with CS, likely associated with a more acidotic rumen environment (Britton and Stock, 1987), as it has been explained before. There are no previous studies in which finishing feedlot cattle were fed a diet with this proportion of wheat DG. Schingoethe et al. (2009) suggested that sulphur content in distillers' grains with solubles feeds may be higher than expected, so diets with a high proportion of these ingredients could reach easier sulphur toxicity levels. In our case, no signs of sulphur toxicity were found during the experiment. The lower energy content of CS compared with the rest of the dietary components resulted in heifers fed CSDG increasing their DMI to meet energy requirements. Mertens (1994) showed that DMI was positively correlated with NDF concentration when energy limits intake.

### ***Feeding Behavior***

As the energy requirements of heifers increased for fattening, there was a progressive increase in daily DMI and meal size. In addition, the feeding rate also increased over the experiment, likely due to an increased BW and bite size throughout the experiment. González et al. (2008) also reported an increase of both concentrate and straw eating rate as the age of heifers increased. As a result, the duration of eating remained constant or was reduced over the experiment.

Heifers fed TMR had lower meal criterion and frequency of visits than those offered diets free-choice. These differences were likely related to feed distribution, since heifers fed TMR had 2 feeder tubs within each pen in which the same diet was offered, whereas heifers fed free-choice diets were forced to visit 2 feeder tubs to complete their meals. Consequently, heifers fed the TMR treatment had lower meal length and meal time than those fed a similar diet free-choice, due to the increased time required to switch between feeders. This is supported by the lack of effect on daily feeding time, which does not include the time in which heifers were absent from the feeders. Others have also reported longer meals in heifers fed free-choice diets compared with mixed rations (Boga et al., 2009). Heifers fed the free-choice treatments also had greater meal size than those fed TMR. Atwood et al. (2001) also reported this effect indicating that greater meal size resulted from the animals being able to choose from a variety of foods with different flavours and nutrient content. However, this effect could also be explained by the fact that heifers fed the TMR may not have been able to eat larger meals because of physical or physiological restrictions related to the high-grain content of the diet. It is also possible that TMR fed heifers had shorter meals indicating that they achieved satiation sooner than those heifers that had to consume their diet from 2 feeders where satiety may have been delayed as a result of the need to switch between dietary components.

The previously described differences in dietary ingredient preference, depending on the offered treatment, can be explained by changes in the feeding behavior. As the eating rate increased over the experiment for all offered dietary ingredients, observed changes in the diet composition were directly related to changes in the DMI, feeding time or frequency of visits to the feed bunk. Therefore, heifers fed the BGCS treatment increased the BG proportion progressively over the experiment by maintaining a constant feeding time with increased DMI, while consumption of CS decreased over the experiment through a reduction in feeding time at a constant DMI. Similarly, heifers fed BGDG increased consumption of BG over the experiment with a constant feeding time, with an increase in DMI, while the DG proportion decreased as a result of a reduction in both feeding time and DMI. This increase in the proportion of BG ingested when it was offered either with CS or with DG was accompanied by an increase in the frequency

of visits to the feed bunk throughout the experiment. The increase in the frequency of visits without affecting the feeding time suggests that heifers ate more BG through more frequent visits to the feed bunk as opposed to increasing the duration of each meal. This could be interpreted as a mechanism used by heifers to eat more BG without negatively affecting the rumen environment, by distributing the daily intake more evenly over time allowing for intermittent periods of rumination and salivation.

### ***Ruminal Fermentation Profile and Blood Parameters***

Ruminal pH, fermentation profile and blood parameters were measured to assess the relationship between diet selection and ruminal and metabolic acidosis. The TMR, BGCS and BGDG treatments did not differ in fermentation, blood or pH profiles. On one hand, this finding suggests that providing heifers a BG and CS diet either as TMR or free-choice did not alter rumen fermentation or blood parameters, even though it did alter feeding behaviour and the relative proportion of BG and CS consumed. In addition, free-choice provision of BG and DG, without forage, also resulted in no noticeable increase in subclinical or clinical acidosis. However, these results must be interpreted with caution as pH parameters were only measured in 4 heifers on each diet. Individuals are known to differ widely in their response to diets that increase the risk of subclinical acidosis, with many of the factors responsible for this variation remaining unclear (Bevans et al., 2005; Penner et al., 2009).

Although cattle offered BGCS and BGDG free-choice increased the proportional intake of BG over the experiment, ruminal pH remained relatively constant with no measurable treatment by time interaction. This suggests that cattle were able to increase BG intake without negatively affecting ruminal pH. This might have been achieved by increased frequency of visits, but metabolic and physiologic adaptations may also be feasible. Cattle fed CSDG had the highest ruminal fluid pH despite the fact that concentrations of VFA were similar in heifers fed BGCS and BGDG diets either before and after feeding. This may reflect the higher amount of physically effective fiber in CS, which stimulates rumination and salivation. Furthermore, the CSDG would have also contained the lowest level of fermentable carbohydrate among diets as well as promoted the highest

level of CP intake, a factor that may have also modulated pH through increased  $\text{NH}_3$  in the rumen (Sauvant et al., 1999).

Cattle fed the TMR treatment had a greater total VFA concentration after feeding than cattle fed free-choice diets. These differences may have resulted from the greater proportion of BG consumed by heifers fed the TMR. However, considering that ruminal liquid samples were obtained 2 h after feed was offered, this greater VFA concentration could also be a consequence of differences in feeding behaviour; i.e., a shorter meal duration for heifers fed TMR, or an increase in the frequency of visits of heifers fed free-choice diets. However, as there were no differences in ruminal pH or blood parameters among diets, our work suggests that the heifers were capable of self-selecting diets with respect to preventing increased risk of subclinical or clinical acidosis.

As expected, cattle consuming CSDG, which had the highest NDF content, had the highest and lowest molar proportions of acetate and propionate, respectively, compared with diets that contained higher levels of fermentable carbohydrate. In addition, heifers fed CSDG had the greatest DMI, suggesting that in the rest of treatments the higher propionate levels could be acting as a negative feedback mechanism to control feed intake, as has been previously described (Farningham and Whyte, 1993; Oba and Allen, 2003).

### ***Animal Performance and Feed Cost***

In the context of this relatively short feeding period, the cattle fed any of the free-choice treatments maintained the same ADG and gain to feed ratio as those fed TMR (Table 7), with the only exception of a trend for a lower gain to feed ratio in heifers fed the CSDG diet. Others have shown similar results in beef cattle fed a free-choice diet vs. a TMR (Atwood et al., 2001; Sahin et al., 2003; Askar et al., 2006). The lack of difference in ADG among treatments leads to the conclusion that offering grain and forage components separately enabled the heifers to select their own diet without affecting negatively the performance relative to provision of a TMR. Furthermore, neither growth rate nor ruminal fluid pH was affected when the source of forage (CS) was eliminated from the diet, as in BGDG treatment. This is an important finding because of the growing availability

of DG and the potential to reduce the forage component of finishing feedlot diets (Klopfenstein et al., 2008; Wierenga et al., 2010).

## **CONCLUSIONS**

Cattle fed either TMR or free-choice diets had similar ruminal fermentation and growth performance, with the exception of the CSDG diet for which ruminal pH levels were consistently higher, and gain to feed ratio trended to be lower. In addition, when BG was the concentrate component in free-choice diets, heifers were able to gradually increase the intake of BG through more frequent visits to the feeder containing BG, and reducing the time spent eating the alternative dietary ingredient (ie. CS or DG). Finishing feedlot cattle fed BG and CS separately selected a diet similar to the composition of a conventional TMR with no signs of acidosis. When cattle were given free-choice access to wheat dry distillers' grain as an alternative to CS, they consumed levels up to 65% of their total daily DMI. Our results suggest that cattle can effectively self-select diets without increasing the risk of subclinical acidosis and still maintaining similar levels of growth and feed efficiency compared with TMR.

## **REFERENCE LIST**

- Agriculture and Agri-Food Canada. [Http://www.agr.gc.ca/](http://www.agr.gc.ca/). Accessed Sept. 15, 2009
- Allen, M. S. 1996. Physical constraints on voluntary intake of forages by ruminants. *J. Anim. Sci.* 74:3063-3075.
- Askar, A. R., J. A. Guada, J. M. González, A. de Vega, and C. Castrillo. 2006. Diet selection by growing lambs offered whole barley and a protein supplement, free choice: Effects on performance and digestion. *Livest. Sci.* 101:81-93.
- Atwood, S. B., F. D. Provenza, R. D. Wiedmeier, and R. E. Banner. 2001. Influence of free-choice vs mixed-ration diets on food intake and performance of fattening calves. *J. Anim. Sci.* 79:3034-3040.
- Bevans, D. W., K. A. Beauchemin, K. S. Schwartzkopf-Genswein, J. J. McKinnon, and T. A. McAllister. 2005. Effect of rapid or gradual grain adaptation on subacute acidosis and feed intake by feedlot cattle. *J. Anim. Sci.* 83:1116-1132.
- Boga, M., A. Sahin, U. Kilic, and M. Gorgulu. 2009. Behavioural responses of dairy calves to cafeteria feeding vs. Single feeding. *J. Anim. Vet. Advances* 8:1573-1578.

- Britton, R. A. and R. A. Stock. 1987. Acidosis, rate of starch digestion and intake. Okla. Agric. Exp. Stn. MP-121. pp 125-137.
- Canada Council of Animal Care (CCAC). CCAC guidelines on animal use protocol review (1997).12pp. Ottawa, ON: CCAC. Available at [http://www.ccac.ca/en/CCAC\\_Programs/Guidelines\\_Policies/gdlines/protocol/protgde.htm](http://www.ccac.ca/en/CCAC_Programs/Guidelines_Policies/gdlines/protocol/protgde.htm). Accessed May 1, 2009.
- Catanese, F., R. Distel, J. Arroquy, R. M. Rodriguez Iglesias, B. Olano, and M. Arzadun. 2009. Diet selection by calves facing pairs of nutritionally complementary foods. *Livest. Sci.* 120:58-65.
- Commun, L., M. M. Mialon, C. Martin, R. Baumont, and I. Veissier. 2009. Risk of subacute ruminal acidosis in sheep with separate access to forage and concentrate. *J. Anim. Sci.* 87:3372-3379.
- Cooper, S. D. B., I. Kyriazakis, and J. D. Oldham. 1996. The effects of physical form of feed, carbohydrate source, and inclusion of sodium bicarbonate on the diet selections of sheep. *J. Anim. Sci.* 74:1240-1251.
- Corrigan, M. E., T. J. Klopfenstein, G. E. Erickson, N. F. Meyer, K. J. Vander Pol, M. A. Greenquist, M. K. Luebke, K. K. Karges, and M. L. Gibson. 2009. Effects of level of condensed distillers solubles in corn dried distillers grains on intake, daily body weight gain, and digestibility in growing steers fed forage diets. *J. Anim. Sci.* 87:4073-4081.
- Day, J. E., I. Kyriazakis, and P. J. Rogers. 1998. Food choice and intake: Towards a unifying framework of learning and feeding motivation. *Nutr. Res. Rev.* 11:25-43.
- Farningham, D. A. H., and C. C. Whyte. 1993. The role of propionate and acetate in the control of food intake in sheep. *Br. J. Nutr.* 70:37-46.
- Forbes, J. M. 1995. Voluntary feed intake and diet selection in farm animals. CAB International, Wallingford.
- Forbes, J. M. 2003. The multifactorial nature of food intake control. *J. Anim. Sci.* 81:E139-144.
- Forbes, J. M., and F. D. Provenza. 2000. Integration of learning and metabolic signals into a theory of dietary choice and food intake. Pages 3-19 in *Ruminant Physiology: digestion, metabolism, growth and reproduction*. P. Cronje, ed., CAB International, Wallingford, UK.
- Gallouin, F., and J. Le Magnen. 1987. Évolution historique des concepts de faim, satiété et appétits. *Réprod. Nutr. Dév.* 27:109-128.
- González, L. A., A. Ferret, X. Manteca, J. L. Ruíz-de-la-Torre, S. Calsamiglia, M. Devant, and A. Bach. 2008. Performance, behavior, and welfare of Friesian heifers housed in pens with two, four, and eight individuals per concentrate feeding place. *J. Anim. Sci.* 86:1446-1458.
- González, L. A., L. B. Correa, A. Ferret, X. Manteca, J. L. Ruíz-de-la-Torre, and S. Calsamiglia. 2009. Intake, water consumption, ruminal fermentation, and stress response of beef heifers fed after different lengths of delays in the daily feed delivery time. *J. Anim. Sci.* 87:2709-2718.



- Illius, A. W., B. J. Tolkamp, and J. Yearsley. 2002. The evolution of the control of food intake. *Proc. Nutr. Soc.* 61:465-472.
- James, S. M., and I. Kyriazakis. 2002. The effect of consumption of foods that differ in energy density and/or sodium bicarbonate supplementation on subsequent diet selection in sheep. *Br. J. Nutr.* 88:81-90.
- Jung, H. G. and M. S. Allen. 1995. Characteristics of Plant-Cell Walls Affecting Intake and Digestibility of Forages by Ruminants. *J. Anim. Sci.* 73:2774-2790.
- Ketelaars, J. J., and B. J. Tolkamp. 1996. Oxygen efficiency and the control of energy flow in animals and humans. *J. Anim. Sci.* 74:3036-3051.
- Keunen, J. E., J. C. Plaizier, I. Kyriazakis, T. F. Duffield, T. M. Widowski, M. I. Lindinger, and B. W. McBride. 2003. Short communication: Effects of subacute ruminal acidosis on free-choice intake of sodium bicarbonate in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 86:954-957.
- Klopfenstein, T. J., G. E. Erickson, and V. R. Bremer. 2008. Board-invited review: Use of distillers by-products in the beef cattle feeding industry. *J. Anim. Sci.* 86:1223-1231.
- Krehbiel, C. R., R. A. Stock, D. W. Herold, D. H. Shain, G. A. Ham, and J. E. Carulla. 1995. Feeding wet corn gluten feed to reduce subacute acidosis in cattle. *J. Anim. Sci.* 73:2931-2939.
- McKinnon, J., A. F. Mustafa, and D. Christensen. 1998. Distiller's byproducts as protein and energy supplements for cattle. *Proceedings of the 19th Western Nutr. Conf. Saskatoon (SK), September 16-17.*
- Mertens, D. R. 1994. Regulation of forage intake. In *forage quality, evaluation, and utilization*, g.C. Fahey, m. Collins, d.R. Mertens, and I.E. Moser. Ed. American Society of Agronomy, Crop Science Society of America, and Soil Science Society of America, Madison, WI.: 450-493.
- Nagaraja, T. G., and K. F. Lechtenberg. 2007. Acidosis in feedlot cattle. *Veterinary Clinics of North America-Food Animal Practice* 23:333-350.
- NRC. 2000. *Nutrient requirements of beef cattle. 7th rev. ed., Update 2000.* Natl. Acad. Sci., Washington, DC.
- Oba, M., and S. Allen. 2003. Intraruminal infusion of propionate alters feeding behavior and decreases energy intake of lactating dairy cows. *J. Nutr.* 133:1094-1099.
- Ojowi, M., J. J. McKinnon, A. Mustafa, and D. A. Christensen. 1997. Evaluation of wheat-based wet distillers' grains for feedlot cattle. *Can. J. Anim. Sci.* 77:447-454.
- Owens, F. N., D. S. Secrist, W. J. Hill, and D. R. Gill. 1998. Acidosis in cattle: a review. *J. Anim. Sci.* 76:275-286.
- Paton, L. J., K. A. Beauchemin, D. M. Veira, and M. A. G. Von Keyserlingk. 2006. Use of sodium bicarbonate, offered free choice or blended into the ration, to reduce the risk of ruminal acidosis in cattle. *Can. J. Anim. Sci.* 86:429-437.

- Penner, G. B., K. A. Beauchemin, and T. Mutsvangwa. 2006. An evaluation of the accuracy and precision of a stand-alone submersible continuous ruminal pH measurement system. *J. Dairy Sci.* 89:2132-2140.
- Penner, G. B., P. Yu, and D. A. Christensen. 2009. Effect of replacing forage or concentrate with wet or dry distillers' grains on the productivity and chewing activity of dairy cattle. *Anim. Feed Sci. Technol.* 153:1-10.
- Phy, T. S., and F. D. Provenza. 1998a. Eating barley too frequently or in excess decreases lambs' preference for barley but sodium bicarbonate and lasalocid attenuate the response. *J. Anim. Sci.* 76:1578-1583.
- Phy, T. S., and F. D. Provenza. 1998b. Sheep fed grain prefer foods and solutions that attenuate acidosis. *J. Anim. Sci.* 76:954-960.
- Sahin, A., M. Keskin, O. Biçer, and S. Gül. 2003. Diet selection by awassi lambs fed individually in a cafeteria feeding system. *Livest. Prod. Sci.* 82:163-170.
- Sauvant, D., F. Meschy, and D. Mertens. 1999. Les composants de l'acidose ruminale et les effets acidogènes de l'acidose. *INRA Prod. Anim.* 12:49-60.
- Schingoethe, D. J., K. F. Kalscheur, A. R. Hippen, and A. D. Garcia. 2009. Invited review: The use of distillers products in dairy cattle diets. *J. Dairy Sci.* 92:5802-5813.
- Shand, P. J., J. J. McKinnon, and D. A. Christensen. 1998. Eating quality of beef from animals fed wet brewers' grains and wheat-based wet distiller's grains. *Can. J. Anim. Sci.* 78:143-146.
- Stubbs, R. J., and B. J. Tolcamp. 2006. Control of energy balance in relation to energy intake and energy expenditure in animals and man: An ecological perspective. *Br. J. Nutr.* 95:657-676.
- Sun, Y. Z., S. Y. Mao, and W. Y. Zhu. 2010. Rumen chemical and bacterial changes during stepwise adaptation to a high-concentrate diet in goats. *Animal* 4:210-217.
- Supelco. 1998. Bulletin 856b: Analyzing fatty acids by packed column gas chromatography. Supelco, Bellefonte, PA.
- Tajima, K., S. Arai, K. Ogata, T. Nagamine, H. Matsui, M. Nakamura, R. I. Aminov, and Y. Benno. 2000. Rumen bacterial community transition during adaptation to high-grain diet. *Anaerobe* 6:273-284.
- Vander Pol, K., G. Erickson, T. Klopfenstein, and M. Greenquist. 2005. Effect of level of wet distillers grains on feedlot performance of finishing cattle and energy value relative to corn. *J. Anim. Sci.* 83:55.
- 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.
- Wierenga, K. T., T. A. McAllister, D. J. Gibb, A. V. Chaves, E. K. Okine, K. A. Beauchemin, and M. Oba. 2010. Evaluation of triticale dried distillers' grain as a substitute for barley silage in feedlot finishing diets. *J. Anim. Sci.* (In press).

- Yearsley, J. M., J. J. Villalba, I. J. Gordon, I. Kyriazakis, J. R. Speakman, B. J. Tolkamp, A. W. Illius, and A. J. Duncan. 2006. A theory of associating food types with their postingestive consequences. *Am. Nat.* 167:705-716.
- Yeates, M. P., B.J. Tolkamp, D. J. Allcroft, and I. Kyriazakis. 2001. The use of mixed distribution models to determine bout criteria for analysis of animal behaviour. *J. Theor. Biol.* 213: 413-425.

## TABLES AND FIGURES

**Table 1.** Dietary components and their chemical composition.

Item	Dietary components <sup>1</sup>			
	TMR	BG	DG	CS
Ingredient composition, % diet DM				
Tempered barley-grain	85.0	95.0	- <sup>2</sup>	-
Wheat dry distillers' grain	-	-	95.0	12.0
Corn silage	10.0	-	-	83.0
Supplement	5.0	5.0	5.0	5.0
Chemical composition <sup>3</sup>				
DM, %	81.2	86.2	93.1	46.0
CP, % DM	14.1	15.6	40.7	12.9
NDF, %DM	20.3	17.5	27.8	42.2
ADF, % DM	6.9	4.4	16.8	26.6
NEm, Mcal/kg	1.97	2.03	2.03	1.56
NEg, Mcal/kg	1.33	1.38	1.38	0.97

<sup>1</sup> TMR: Total mixed ration; BG: dry-rolled barley grain component of the free choice diets BGCS and BGDG; DG: wheat dry distillers' grain component of the free choice diets BGDG and DGCS; CS: corn silage component of the free choice diets BGCS and DGCS.

<sup>2</sup> Ingredient not included in the diet.

<sup>3</sup> ADF: Acid detergent fiber; NDF: neutral detergent fiber; NEm: net energy for maintenance; NEg: net energy for growth.

**Table 2.** Feed intake and feeding behavior of heifers consuming TMR, BGCS, BGDG and CSDG treatments, determined individually (n = 20) over the experiment.

Item	Treatment <sup>1</sup>				SEM	P-value <sup>2</sup>		
	TMR	BGCS	BGDG	CSDG		Trt	Time	Trt × T
DMI, kg DM/d	8.97 <sup>bc</sup>	8.33 <sup>c</sup>	9.37 <sup>ab</sup>	9.71 <sup>a</sup>	0.254	<0.01	<0.01	<0.01
Meal characteristics								
Size, kg DM/meal	1.13 <sup>b</sup>	1.24 <sup>ab</sup>	1.37 <sup>a</sup>	1.37 <sup>a</sup>	0.065	0.03	<0.01	0.31
Meal duration, min/meal	15.3 <sup>c</sup>	24.8 <sup>ab</sup>	20.6 <sup>bc</sup>	27.8 <sup>a</sup>	1.65	<0.01	<0.01	0.07
Meal time, min/d	119.0 <sup>c</sup>	164.6 <sup>ab</sup>	137.9 <sup>bc</sup>	194.6 <sup>a</sup>	9.54	0.01	<0.01	<0.01
Frequency, No./d	8.53 <sup>a</sup>	7.15 <sup>b</sup>	7.34 <sup>b</sup>	7.52 <sup>b</sup>	0.332	0.02	<0.01	0.07
Feeding time, min/d	83.3 <sup>b</sup>	74.2 <sup>b</sup>	73.1 <sup>b</sup>	124.5 <sup>a</sup>	4.19	<0.01	<0.01	<0.01
Feeding rate, g DM/min	112.9 <sup>b</sup>	119.7 <sup>ab</sup>	134.0 <sup>a</sup>	81.1 <sup>c</sup>	4.43	<0.01	<0.01	0.01
Frequency of visits, No./d	18.5 <sup>b</sup>	33.5 <sup>a</sup>	30.6 <sup>a</sup>	36.7 <sup>a</sup>	1.46	0.01	<0.01	<0.01

<sup>1</sup> Treatments were a total mixed ration (TMR) and three free choice diets consisting of components offered separately; barley grain and corn silage (BGCS), barley grain and wheat dry distillers' grain (BGDG), and wheat dry distillers' grain and corn silage (CSDG).

<sup>2</sup> Fixed effects were treatment (Trt), Time (T), and treatment within time (Trt×T).

<sup>a, b, c</sup> Means with different superscripts in the same row are different ( $P < 0.05$ ).

**Table 3.** Feeding behavior of heifers consuming CS, BG and DG when offered separately in the free-choice dietary treatments (n = 20).

Item	Treatment <sup>1</sup>			SEM	P-value <sup>2</sup>		
	BGCS	BGDG	CSDG		Trt	Time	Trt × T
<b>CS</b>							
% of DMI, kg CS/total DMI	20.4	- <sup>3</sup>	36.6	1.99	0.02	0.046	<0.01
DMI, kg/d	1.65	-	3.52	0.16	0.01	0.04	<0.01
Feeding time, min/d	30.6	-	67.5	5.30	0.03	0.047	<0.01
Feeding rate, g DM/min	62.7	-	54.8	2.40	0.02	<0.01	0.08
Frequency of visits, No./d	13.5	-	19.9	1.04	0.03	<0.01	<0.01
<b>BG</b>							
% of DMI, kg BG/total DMI	79.6	62.0	-	1.99	0.03	<0.01	0.01
DMI, kg/d	6.70	5.79	-	0.18	0.01	<0.01	0.11
Feeding time, min/d	43.7	41.9	-	1.82	0.48	<0.01	<0.01
Feeding rate, g DM/min	163.7	147.2	-	6.08	0.06	<0.01	<0.01
Frequency of visits, No./d	20.1	17.4	-	0.97	0.30	<0.01	<0.01
<b>DG</b>							
% of DMI, kg DG/total DMI	-	38.1	63.4	1.97	0.01	<0.01	<0.01
DMI, kg/d	-	3.59	6.19	0.34	0.046	0.47	<0.01
Feeding time, min/d	-	31.2	57.0	2.15	<0.01	<0.01	<0.01
Feeding rate, g DM/min	-	122.3	114.7	4.82	0.28	<0.01	<0.01
Frequency of visits, No./d	-	13.2	16.8	0.74	<0.01	<0.01	<0.01

<sup>1</sup> Treatments were free choice diets consisting of components offered separately; barley grain and corn silage (BGCS), barley grain and wheat dry distillers' grain (BGDG), and wheat dry distillers' grain and corn silage (CSDG).

<sup>2</sup> Fixed effects were treatment (Trt), Time (T), and treatment within time (Trt×T).

<sup>3</sup> Ingredient not included in the diet.

**Table 4.** Daily ruminal fluid pH profile determined in 16 feedlot cattle (n = 4) consuming TMR, BGCS, BGDG and CSDG treatments, over 4 measurement periods (from d 1 to 4, 7 to 14, 21 to 28, and 42 to 49).

Item	Treatment <sup>1</sup>				SEM	P-value <sup>2</sup>		
	TMR	BGCS	BGDG	CSDG		Trt	Time	T × T
Daily pH								
Mean	5.66 <sup>b</sup>	5.86 <sup>b</sup>	5.72 <sup>b</sup>	6.25 <sup>a</sup>	0.110	0.01	0.83	0.62
Maximum	6.63	6.83	6.54	6.90	0.147	0.28	0.39	0.22
Minimum	4.96 <sup>b</sup>	5.00 <sup>b</sup>	5.18 <sup>ab</sup>	5.44 <sup>a</sup>	0.092	0.01	0.51	0.75
Time, % of the day								
< 5.8	0.62 <sup>a</sup>	0.48 <sup>a</sup>	0.58 <sup>a</sup>	0.16 <sup>b</sup>	0.084	<0.01	0.89	0.73
< 5.5	0.44 <sup>a</sup>	0.33 <sup>a</sup>	0.42 <sup>a</sup>	0.06 <sup>b</sup>	0.091	0.03	0.78	0.70
< 5.2	0.22	0.18	0.23	0.01	0.073	0.22	0.65	0.58
Area, h·pH/d								
< 5.8	7.17 <sup>a</sup>	5.56 <sup>ab</sup>	7.05 <sup>a</sup>	0.96 <sup>b</sup>	1.711	0.05	0.81	0.58
< 5.5	3.30	2.65	3.36	0.21	1.428	0.15	0.78	0.52
< 5.2	0.91	0.83	0.95	0.01	0.702	0.36	0.94	0.41

<sup>1</sup> Treatments were a total mixed ration (TMR) and three free choice diets consisting of components offered separately; barley grain and corn silage (BGCS), barley grain and wheat dry distillers' grain (BGDG), and wheat dry distillers' grain and corn silage (CSDG).

<sup>2</sup> Fixed effects were treatment (Trt), Time, and treatment within time (T×T).

<sup>a, b</sup> Means with different superscripts in the same row are different ( $P < 0.05$ ).

**Table 5.** Ruminal fermentation profile determined in 16 feedlot cattle (n = 4) consuming TMR, BGCS, BGDG and CSDG treatments, on d 7 and 42 before feeding, and d 4 and 49 after feeding.

Item	Treatment <sup>1</sup>				SEM	P-value <sup>2</sup>		
	TMR	BGCS	BGDG	CSDG		Trt	Time	Trt × T
Before feeding								
Total VFA concentration, mM	119.6	110.9	105.2	88.3	14.15	0.53	0.03	0.50
VFA proportion, mol/100mol								
Acetate	42.2	46.6	47.5	55.7	4.14	0.15	0.90	0.89
Propionate	42.8	41.5	37.5	28.5	4.30	0.11	0.79	0.91
Butyrate	9.16	6.78	9.16	10.2	0.806	0.06	0.68	0.66
Branched-chain VFA <sup>3</sup>	1.71	2.32	2.32	2.42	0.465	0.54	0.29	0.53
Acetate to propionate ratio	1.00	1.16	1.46	2.15	0.452	0.10	0.95	0.90
Lactate concentration, mM	0.06	0.06	0.15	0.07	0.320	0.20	0.06	0.25
After feeding								
Total VFA concentration, mM	147.8 <sup>a</sup>	113.1 <sup>b</sup>	115.5 <sup>b</sup>	99.0 <sup>b</sup>	7.14	<0.01	0.01	0.94
VFA proportion, mol/100mol								
Acetate	44.6 <sup>b</sup>	46.6 <sup>b</sup>	46.5 <sup>b</sup>	54.2 <sup>a</sup>	1.21	0.01	0.25	0.44
Propionate	44.9 <sup>a</sup>	41.6 <sup>a</sup>	40.1 <sup>a</sup>	26.8 <sup>b</sup>	1.12	<0.01	0.03	0.46
Butyrate	6.35 <sup>b</sup>	6.90 <sup>b</sup>	7.97 <sup>b</sup>	12.7 <sup>a</sup>	0.89	<0.01	0.63	0.68
Branched-chain VFA <sup>3</sup>	1.49	1.96	1.99	2.67	0.308	0.06	0.84	0.05
Acetate to propionate ratio	0.99 <sup>b</sup>	1.12 <sup>b</sup>	1.18 <sup>b</sup>	2.05 <sup>a</sup>	0.068	<0.01	0.03	0.08
Lactate concentration, mM	0.08	0.12	0.12	0.10	0.053	0.87	<0.01	0.82

<sup>1</sup> Treatments were a total mixed ration (TMR) and three free choice diets consisting of components offered separately; barley grain and corn silage (BGCS), barley grain and wheat dry distillers' grain (BGDG), and wheat dry distillers' grain and corn silage (CSDG).

<sup>2</sup> Fixed effects were treatment (Trt), Time (T), and treatment within time (Trt×T).

<sup>3</sup> Includes isobutyrate and isovalerate.

<sup>a, b</sup> Means with different superscripts in the same row are different ( $P < 0.05$ ).



**Table 6.** Blood variables determined in 16 feedlot cattle ( $n = 4$ ) consuming TMR, BGCS, BGDG and CSDG treatments, on d 0, 7, 42 and 49 of the experiment, prior to feed delivery.

Item	Treatment <sup>1</sup>				SEM	<i>P</i> -value <sup>2</sup>		
	TMR	BGCS	BGDG	CSDG		Trt	Time	Trt × T
pH	7.46	7.45	7.44	7.46	0.009	0.39	0.11	0.31
pCO <sub>2</sub> , kPa	40.8	42.8	43.0	40.4	1.44	0.48	0.03	0.46
Total CO <sub>2</sub> , mM	27.9	28.5	27.9	27.5	1.082	0.93	0.12	0.81
Anion Gap	17.3	17.5	17.5	17.1	1.304	0.98	0.38	0.65
Na <sup>+</sup> , mM	142.0	144.1	142.6	143.3	1.068	0.56	0.01	0.15
K <sup>+</sup> , mM	4.07	3.99	4.07	3.94	0.154	0.78	0.15	0.98
Cl <sup>-</sup> , mM	102.1	103.5	102.3	103.8	1.647	0.55	0.06	0.51
HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> , mM	26.7	27.2	26.6	26.3	1.045	0.93	0.14	0.82
PCV, mL/100 mL of blood	42.9	41.2	44.1	43.7	1.857	0.75	0.92	0.52

<sup>1</sup> Treatments were a total mixed ration (TMR) and three free choice diets consisting of components offered separately; barley grain and corn silage (BGCS), barley grain and wheat dry distillers' grain (BGDG), and wheat dry distillers' grain and corn silage (CSDG).

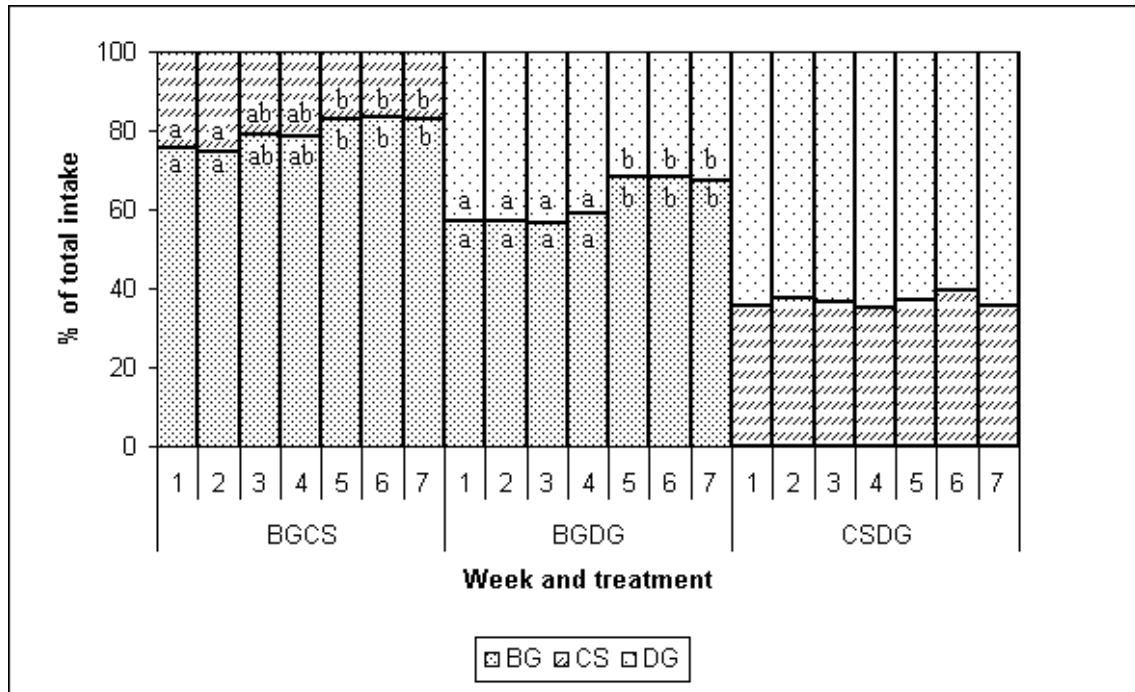
<sup>2</sup> Fixed effects were treatment (Trt), Time (T), and treatment within time (Trt×T).

**Table 7.** Performance variables of heifers consuming TMR, BGCS, BGDG and CSDG treatments, determined individually (n = 20) over the experiment.

Item	Treatment <sup>1</sup>				SEM	<i>P</i> -value
	TMR	BGCS	BGDG	CSDG		Treatment
ADG, kg BW/d	1.86	1.82	1.78	1.67	0.082	0.45
Gain to feed ratio, kg BW/kg DMI	0.22	0.23	0.20	0.18	0.009	0.07

<sup>1</sup> Treatments were a total mixed ration (TMR) and three free choice diets consisting of components offered separately; barley grain and corn silage (BGCS), barley grain and wheat dry distillers' grain (BGDG), and wheat dry distillers' grain and corn silage (CSDG).

**Figure 1.** Dietary component preference (as % of total DMI) of each free-choice treatment, obtained individually each week over the experiment (n = 20).



Treatments consisted of components offered separately; barley grain and corn silage (BGCS), barley grain and wheat dry distillers' grain (BGDG), and wheat dry distillers' grain and corn silage (CSDG). The treatment × time interaction was significant for CS ( $P < 0.01$ ), BG ( $P = 0.01$ ), and DG ( $P < 0.01$ ) dietary components. Different letter ( $a, b$ ) in the same dietary component and treatment are different ( $P < 0.05$ ).





**CAPÍTULO VI**  
**Discusión general**



## **1. INTRODUCCIÓN**

A lo largo de la presente tesis doctoral, se ha abordado el problema de los trastornos digestivos en terneros de engorde desde diferentes puntos de vista, abarcando de forma más o menos específica, desde el uso de diferentes aditivos modificadores de la fermentación ruminal, hasta el manejo de la alimentación en las explotaciones. Esta aproximación multidisciplinar ha permitido estar en contacto con una bibliografía de temática muy diversa, y ha impulsado el desarrollo y aprendizaje de una gran variedad de técnicas, desde PCR cuantitativa, hasta el análisis de la conducta de alimentación de un rumiante.

Por otro lado, el enfoque del tema desde diferentes perspectivas ha propiciado que el desarrollo de la presente tesis no fuera de forma "lineal", es decir, dónde los diferentes experimentos fueran profundizando paulatinamente sobre una cuestión en concreto. Aunque todos los experimentos aquí expuestos mantienen un objetivo común, como es el estudio de la prevención de los trastornos digestivos en terneros de engorde alimentados sin antibióticos, cada uno lo aborda desde un punto de vista distinto y que no está directamente vinculado al resto. Por este motivo, en este capítulo no se han analizado los resultados obtenidos en su conjunto, ya que el análisis individual no aportaría más de lo que ya lo hace cada discusión por separado.

El presente capítulo, por tanto, lo que pretende es describir el desarrollo cronológico de la tesis, justificando las decisiones tomadas durante su desarrollo, para acabar apuntando algunas consideraciones generales y perspectivas de futuro.

## **2. DESARROLLO CRONOLÓGICO**

El origen de esta tesis tuvo lugar en el año 2006, coincidiendo con la entrada en vigor de la directiva de la Unión Europea (1831/2003/CEE) que prohibía el uso de antibióticos ionóforos en la alimentación animal. El anuncio de esta prohibición había dado pie a que, desde algunos años



antes, se invirtieran esfuerzos y recursos en la investigación y desarrollo de alternativas a dichos antibióticos (Jouany y Morgavi, 2007). Concretamente en nuestro departamento, ya se habían establecido convenios con diferentes empresas para estudiar, principalmente, el uso de extractos de plantas y aceites esenciales como modificadores de la fermentación ruminal. Fruto de esos convenios se llevaron a cabo diferentes experimentos que resultaron en la publicación de hasta 15 artículos científicos (Tabla 1, Anexo 2) y 4 tesis doctorales (Busquet, 2005; Cardozo, 2005; Castillejos, 2005; Blanch, 2009). Paralelamente, otra de las líneas de investigación que se desarrollaba en el departamento era el estudio de los efectos de la dieta y el manejo sobre el pH, la fermentación ruminal y el comportamiento de alimentación de terneros de engorde (Tabla 2, Anexo 2). Así pues, la presente tesis doctoral se enmarca en este contexto, dónde confluye el interés por los aditivos modificadores de la fermentación ruminal, así como por los efectos de la dieta, el manejo y el comportamiento de alimentación sobre el pH ruminal.

Los dos primeros trabajos experimentales incluidos en esta tesis fueron el resultado de convenios puntuales con empresas, que tenían el objetivo de evaluar los efectos de sus productos (a base de levaduras) sobre la fermentación ruminal bajo determinadas circunstancias. De esta manera, el primer estudio (Capítulo III) se inició gracias a un convenio entre la Universidad Autónoma de Barcelona (UAB) y *Lallemand SAS* (Blagnac, France). El objetivo era evaluar los efectos de uno de sus productos a base de levaduras sobre la fermentación ruminal, así como las diferencias existentes cuando el almidón de la dieta provenía de maíz o cebada. La hipótesis era que ante dietas ricas en concentrado, y especialmente con almidones de rápida fermentación, la adición de levaduras vivas sería capaz de estabilizar la fermentación ruminal evitando grandes caídas del pH, y en consecuencia, la posible aparición de acidosis. Es por esto que para realizar el experimento se utilizó el sistema de fermentadores de doble flujo continuo (Hoover y col., 1976), ya que permitía tener unas condiciones de fermentación homogéneas entre tratamientos, a la vez que hacer un control exhaustivo del pH del líquido ruminal y obtener datos de las digestibilidades de los nutrientes. Además,

este sistema permite obtener resultados de una forma más rápida y económica respecto a los estudios in vivo.

Este experimento fue el primer trabajo que se realizaba en el departamento con un producto a base de levaduras, cambiando ligeramente el registro respecto a estudios previos que se centraban más en el uso de aceites esenciales y extractos de plantas. En el diseño experimental se incluyeron dos técnicas analíticas que se habían puesto a punto recientemente en el laboratorio, como son la cuantificación del número de copias del gen 16S rRNA de *Streptococcus bovis* y *Megasphaera elsdenii* (técnica elaborada y descrita ampliamente por Blanch y col., 2010), y la determinación de las actividades enzimáticas proteolítica, amilolítica y fibrolítica (técnica desarrollada por Arcos, 2006). Los resultados obtenidos de esta última técnica, sin embargo, no fueron incluidos en la versión final del artículo. Además, con motivo de este experimento también se puso a punto la técnica de determinación de la producción de gas y metano, con su correspondiente Procedimiento Normalizado de Trabajo (Anexo 3).

El segundo experimento (capítulo IV), también se realizó gracias a un convenio entre la UAB y la empresa Diamond V Mills Inc. (Cedar Rapids, EEUU). Igual que en el primer trabajo, el producto a estudiar también era a base de levaduras, y también se querían evaluar sus efectos sobre la fermentación ruminal y su posible implicación en la prevención de trastornos digestivos, a la vez que describir los cambios ocurridos en el rumen durante un cambio brusco de la dieta. La hipótesis era que la adición del producto ayudaría a reducir la aparición y/o la gravedad del trastorno digestivo, o bien facilitaría su recuperación. Por este motivo el experimento se realizó in vivo, en las instalaciones del "Servei de Granges i Camps Experimentals" de la Universidad Autònoma de Barcelona.

Para la elaboración del diseño experimental se adaptó un protocolo empleado en un estudio anterior en el departamento (Blanch y col., 2009), en el cual también se perseguía provocar un trastorno digestivo en terneros de engorde mediante un cambio brusco de la dieta. Dicho trastorno podría tratarse de acidosis, por lo que se analizaron los cambios en el pH ruminal,

o bien timpanismo, por lo que en este trabajo también se estudiaron los efectos sobre las propiedades físico-químicas del líquido ruminal y su posible implicación en la formación de espuma. Con este fin, además de analizar la viscosidad del líquido ruminal, se desarrolló y se puso a punto una técnica nueva para el laboratorio, como era la determinación del poder espumante del líquido ruminal (Anexo 3), adaptada de Min y col. (2005).

Tras haber trabajado en diferentes ocasiones con levaduras y otros tipos de aditivos modificadores de la fermentación ruminal (Moya y col., 2007), el contacto con otros experimentos del departamento (Faleiro y col., 2007; González y col., 2008), propicia el interés por otros factores relacionados con la aparición de trastornos digestivos, como el comportamiento animal y el manejo nutricional de la explotación. De esta manera, para el tercer y último trabajo experimental de la tesis (capítulo V), surge la oportunidad de realizar una estancia en el Lethbridge Research Centre, del Agriculture and Agri-Food Canada, dónde se toma parte de un proyecto que estudia la relación entre el tipo de dieta ingerida, cómo es ofrecida, la conducta de alimentación de los terneros de engorde, y la aparición de acidosis. Si bien no participamos directamente en la elaboración del diseño experimental, este experimento nos permitió conocer nuevos métodos de trabajo y técnicas de estudio relacionadas con el análisis de la conducta de alimentación, aplicables a futuros experimentos en nuestro departamento.

### **3. REFLEXIONES GENERALES**

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

#### **3.1. No existe una única alternativa a los antibióticos**

La aproximación al problema desde diferentes puntos de vista permite tener una visión global de la situación, de la cual se desprende que no existe una única alternativa a los antibióticos promotores del crecimiento que, por sí sola, reduzca la incidencia de patologías digestivas y a la vez

mantenga el ritmo y los costes productivos previos a su prohibición. La mejor solución pasa por combinar diferentes estrategias relacionadas con el manejo de la alimentación (Schwartzkopf-Genswein y col., 2003; DeVries y Von Keyserlingk, 2009), la nutrición (Cooper y col., 1996; Mertens, 1997; Turgeon y col., 2010), y las condiciones específicas de los animales (Phy y Provenza, 1998; Kyriazakis y col., 1999; Dohme y col., 2008), con el objetivo final de optimizar la productividad sin comprometer el estado de salud.

Las medidas tomadas por el sector en los primeros 5 años tras la prohibición del uso de antibióticos han ido encaminadas en este sentido, basándose en mantener un correcto manejo de los programas de alimentación de la granja, un replanteamiento de la formulación de las dietas para garantizar una buena salud ruminal, y el uso complementario de aditivos, como pueden ser tampones (bicarbonato), alcalinizantes (óxido de magnesio) y/o algún otro que garantice ser efectivo y rentable bajo las circunstancias concretas de la explotación.

### **3.2. Historial científico de los aditivos**

Como hemos dicho anteriormente, una vez implementadas medidas correctoras sobre la nutrición y el manejo de la explotación, es posible obtener un beneficio mediante el uso de aditivos. En el sector de la nutrición de rumiantes, existe una amplia gama de aditivos que buscan influir en la fermentación ruminal para mejorar la eficiencia productiva del animal, o bien reducir la incidencia de alguna enfermedad, pero que se diferencian en su mecanismo de acción, o en la naturaleza de su principio activo, como aceites esenciales (Calsamiglia y col., 2007), levaduras (Chaucheyras-Durand y col., 2008) o saponinas (Cheeke, 2000), entre otros. Bajo unas condiciones determinadas, sin embargo, no es fácil discernir entre usar uno u otro en función de sus efectos, ya que cada uno de ellos ha sido estudiado bajo diferentes condiciones, en lo referente a la dosis, la dieta, o tipo de sistema productivo.

Además, tras la prohibición del uso de antibióticos en la nutrición animal también aumentó la comercialización de aditivos que, más que por el conocimiento exacto de sus aptitudes, aparecían por la necesidad de cubrir un vacío en el mercado. Los convenios con empresas privadas son una buena fórmula para financiar investigación, a la vez que permite ofrecer un servicio al sector industrial. Sin embargo, no existen muchos aditivos que cuenten con un amplio y riguroso historial científico que garantice su eficacia, por lo que antes de decantarse por uno u otro, es recomendable asegurarse de que dicho producto ha demostrado ser eficiente y que su uso va a ser rentable.

### **3.3. Definición de trastorno digestivo**

Cuando en el transcurso de la tesis hemos hablado de “trastornos digestivos” (o “digestive upset” en los artículos), nos referíamos casi exclusivamente a acidosis y timpanismo. Las condiciones específicas bajo las que hemos trabajado, con dietas ricas en concentrado (capítulo III), cambios bruscos en la ración (capítulo IV), o dietas sin aporte de fibra forrajera (capítulo V), puede propiciar la aparición de acidosis, tanto aguda como subclínica (Nagaraja y Titgemeyer, 2007), timpanismo, o incluso ambos simultáneamente (Cheng y col., 1998). Es por esto que diagnosticar de qué se trata en cada caso individual era complicado, y preferimos englobar ambos trastornos en un solo concepto.

Además, siguen apareciendo nuevos estudios sobre la etiología y patogenia de estas enfermedades, los cuales permiten detectar nuevos signos específicos que facilitan el diagnóstico de, por ejemplo, la acidosis ruminal subclínica (Gozho y col., 2005; Khafipour y col., 2009a). Por todo esto, hemos preferido no aventurarnos a diagnosticar exactamente el tipo de trastorno, y nos hemos limitado a describir lo que nos encontrábamos.

## **4. PERSPECTIVAS DE FUTURO**

En el último año han seguido apareciendo nuevos avances a nivel del diagnóstico (Gatto y col., 2010; Kaur y col., 2010) y etiología (Fernando y

col., 2010; Khafipour y col., 2009b y 2010) de los trastornos digestivos en rumiantes, con especial énfasis en la acidosis ruminal subclínica (Oba y Wertz-Lutz, 2010). También se ha profundizado más en el conocimiento sobre la nutrición (Zebeli y col., 2010) y el comportamiento animal (Greter y col., 2010) relacionados con dichos trastornos, lo cual implica que en un futuro próximo, probablemente podamos contar con nuevas herramientas y mecanismos de acción con los que poder reducir la incidencia de este tipo de enfermedades.

Los avances tecnológicos a nivel genético, molecular y microbiológico, también han permitido analizar y desarrollar nuevos tratamientos y aditivos que combaten la aparición de trastornos digestivos (Henning y col., 2010; Hutton y col., 2010). En el futuro, será importante que los proyectos de investigación sobre productos existentes actualmente en el mercado, o bien tratamientos de nueva creación, se adapten a los últimos avances relacionados con los trastornos digestivos, de cara a identificar exactamente sus mecanismos de acción, y determinar bajo que condiciones son efectivos.

## 5. BIBLIOGRAFÍA

- Arcos, M. L. 2006. Puesta a punto de técnicas para evaluar la actividad enzimática durante la fermentación ruminal en un sistema de doble flujo continuo. Trabajo de Máster.
- Blanch, M. 2009. Estudio de la acidosis ruminal y nuevas estrategias de prevención. Tesis doctoral. <http://www.tdx.cat/TDX-0925109-112717>.
- Blanch, M., S. Calsamiglia, N. DiLorenzo, A. DiCostanzo, S. Muetzel, y R. J. Wallace. 2009. Physiological changes in rumen fermentation during acidosis induction and its control using a multivalent polyclonal antibody preparation in heifers. *J. Anim. Sci.* 87:1722-1730.
- Blanch, M., S. Calsamiglia, M. Devant, y A. Bach. 2010. Effects of acarbose on ruminal fermentation, blood metabolites and microbial profile involved in ruminal acidosis in lactating cows fed a high-carbohydrate ration. *J. Dairy Res.* 77:123-128.
- Busquet, M. 2005. Extractos de plantas como modificadores de la fermentación microbiana ruminal. Tesis doctoral.
- Calsamiglia, S., M. Busquet, P. W. Cardozo, L. Castillejos, y A. Ferret. 2007. Essential oils as modifiers of rumen microbial fermentation. *J. Dairy Sci.* 90:2580-2595.

- Cardozo, P. W. 2005. Efectos de los extractos de plantas sobre las características de fermentación microbiana ruminal en sistemas in vitro e in vivo. Tesis doctoral. <http://www.tdx.cat/TDX-0629107-125955>.
- Castillejos, L. 2005. Modificación de la fermentación microbiana ruminal mediante compuestos de aceites esenciales. Tesis doctoral. <http://www.tdx.cat/TDX-0119106-112907>.
- Chaucheyras-Durand, F., N. D. Walker y A. Bach. 2008. Effects of active dry yeasts on the rumen microbial ecosystem: Past, present and future. *Anim. Feed Sci. Technol.* 145:5-26.
- Cheeke, P. R. 2000. Actual and potential applications of *Yucca schidigera* and *Quillaja saponaria* saponins in human and animal nutrition. *J. Anim. Sci.* 77:1-12.
- Cheng, K. J., T. A. McAllister, J. D. Popp, A. N. Hristov, Z. Mir, y H. T. Shin. 1998. A review of bloat in feedlot cattle. *J. Anim. Sci.* 76:299-308.
- Cooper, S.D.B., I. Kyriazakis y J. D. Oldham. 1996. The effects of physical form of feed, carbohydrate source, and inclusion of sodium bicarbonate on the diet selections of sheep. *J. Anim. Sci.* 1996. 74:1240-1251.
- DeVries, T. J. y M. A. G. von Keyserlingk. 2009. Short communication: Feeding method affects the feeding behavior of growing dairy heifers. *J. Dairy Sci.* 92:1161-1168.
- Dohme, F., T. J. DeVries, y K. A. Beauchemin. 2008. Repeated ruminal acidosis challenges in lactating dairy cows at high and low risk for developing acidosis: ruminal pH. *J. Dairy Sci.* 91:3554-3567.
- Faleiro, A. G., A. Ferret, X. Manteca, J. L. Ruiz de la Torre y S. Calsamiglia. 2007. Suppression of cereal straw in the feeding of calfs. Behavioural effects on the animals ITEA-*Información técnica económica agraria*, 165-167.
- Fernando S. C., H. T. Purvis, F. Z. Najar, L. O. Sukharnikov, C. R. Krehbiel, T. G. Nagaraja, B. A. Roe y U. Desilva. 2010. Rumen microbial population dynamics during adaptation to a high-grain diet. *Appl. Environ. Microbiol.* 76:7482-7490.
- Gatto, M., M. Ganesella y M. Morgante. 2010. Application of infrared thermography as tools to diagnosis subacute ruminal acidosis of dairy cows. *Large Aanim. Rev.* 16:7-12.
- González, L. A., A. Ferret, X. Manteca, J. L. Ruiz de la Torre, S. Calsamiglia, M. Devant y A. Bach. 2008. Effect of the number of concentrate feeding places per pen on performance, behaviour, and welfare indicators of Friesian calves during the first month after arrival at the feedlot. *J. Anim. Sci.* 86:419-431.
- Gozho, G. N., J. C. Plaizier, D. O. Krause, A. D. Kennedy, y K. M. Wittenberg. 2005. Subacute ruminal acidosis induces ruminal lipopolysaccharide endotoxin release and triggers an inflammatory response. *J. Dairy Sci.* 88:1399-1403.
- Greter, A. M., K. E. Leslie, G. J. Mason, B. W. McBride y T. J. DeVries. 2010. Feed delivery method affects the learning of feeding and competitive behavior in dairy heifers. *J. Dairy Sci.* 93:3730-3737.

- Henning, P. H., C. H. Horn, D. G. Steyn, H. H. Meissner y F. M. Hagg. 2010. The potential of *Megasphaera elsdenii* isolates to control ruminal acidosis. *Anim, Feed Sci. Technol.* 157:13-19.
- Hoover, W. H., B. A. Crooker, y C. J. Sniffen. 1976. Effects of differential solid-liquid removal rates on protozoa numbers in continuous cultures of rumen contents. *J. Anim. Sci.* 43:528-534.
- Hutton, P. G., T. G. Nagaraja, C. L. White y P. E. Vercoe. 2010. Screening plants for the antimicrobial control of lactic acidosis in ruminant livestock. En: *In vitro screening of plant resources for extra-nutritional attributes in ruminants: nuclear and related methodologies*, pp. 159-189.
- Jouany, J. P. y D. P. Morgavi. 2007. Use of "natural" products as alternatives to antibiotic feed additives in ruminant production. *Animal* 10: 1443-1466.
- Kaur, R., S. C. García, A. Horadagoda y W. J. Fulkerson. 2010. Evaluation of rumen probe for continuous monitoring of rumen pH, temperature and pressure. *Anim. Prod. Sci.* 50:98-104.
- Khafipour, E., D. O. Krause y J. C. Plaizier. 2009a. A grain-based subacute ruminal acidosis challenge causes translocation of lipopolysaccharide and triggers inflammation. *J. Dairy Sci.* 92:1060-1070.
- Khafipour E., S. Li, J. C. Plaizier y D. O. Krause. 2009b. Rumen microbiome composition determined using two nutritional models of subacute ruminal acidosis. *Appl. Environ. Microbiol.* 75:7115-7124.
- Khafipour E., J. C. Plaizier, P. C. Aikman y D. O. Krause. 2010. Population structure of rumen *Escherichia coli* associated with subacute ruminal acidosis (SARA) in dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 94:351-360.
- Kleen J. L., G. A. Hooijer, J. Rehage y J. P. Noordhuizen. 2009. Subacute ruminal acidosis in Dutch dairy herds. *Vet. Rec.* 164:681-683.
- Kyriazakis, I., B. J. Tolkamp y G. Emmans. 1999. Diet selection and animal state: an integrative framework. *Proc. Nutr. Soc.* 58:765-772.
- Mertens, D. R. 1997. Creating a system for meeting the fiber requirements of dairy cows. *J. Dairy Sci.* 80:1463-1481.
- Min, B. R., W. E. Pinchak, J. D. Fulford, y R. Puchala. 2005. Effect of feed additives on in vitro and in vivo rumen characteristics and frothy bloat dynamics in steers grazing wheat pasture. *Anim. Feed Sci. Technol.* 124:615-629.
- Moya, D., S. Calsamiglia, A. Ferret y J.I. Fandiño. 2007. Screening for the effects of commercial additives at two pH levels on in vitro rumen microbial fermentation of a high-concentrate beef cattle diet. 90:238 (Abstract).
- Nagaraja, T. G. y E. C. Titgemeyer. 2007. Ruminal acidosis in beef cattle: The current microbiological and nutritional outlook. *J. Dairy Sci.* 90:E17-E38.
- Oba M., A. E. y Wertz-Lutz. 2010. Acidosis: new insights into the persistent problem. *J. Anim. Sci.* Publicado on line doi:10.2527/jas.2010-3727.



- Phy, T. S. y F. D. Provenza. 1998. Eating barley too frequently or in excess decreases lambs' preference for barley but sodium bicarbonate and lasalocid attenuate the response. *J. Anim. Sci.* 76:1578-1583
- Schwartzkopf-Genswein, K. S., K. A. Beauchemin, D. J. Gibb, D. H. Crews, Jr., D. D. Hickman, M. Streeter, y T. A. McAllister. 2003. Effect of bunk management on feeding behavior, ruminal acidosis and performance of feedlot cattle: A review. *J. Anim. Sci.* 81:E149-E158.
- Turgeon, O. A., J. I. Szasz, W. C. Koers, M. S. Davis y K. J. Vander Pol. 2010. Manipulating grain processing method and roughage level to improve feed efficiency in feedlot cattle. *J. Anim. Sci.* 88:284-295.
- Unión Europea. 2003. Regulation (EC) No 1831/2003 of the European Parliament and of the council of 22 September 2003 on additives for use in animal nutrition. *Off. J. Eur. Union* 10/18/2003:L268-29-L268/43.
- Zebeli, Q., D. Mansmann, H. Steingass y B. N. Ametaj. 2010. Balancing diets for physically effective fibre and ruminally degradable starch: A key to lower the risk of sub-acute rumen acidosis and improve productivity of dairy cattle. *Livest. Sci.* 127:1-10.





**CAPÍTULO VII**  
**Conclusiones**



Los resultados obtenidos en esta tesis fueron los siguientes:

1. La adición de levaduras vivas redujo la concentración de nitrógeno amoniacal en dietas ricas en almidones tanto de rápida como de lenta fermentación.
2. La adición de levaduras vivas pareció estabilizar el pH ruminal ante dietas ricas en almidones rápidamente fermentables, evitando descensos bruscos del pH después de su ingestión.
3. Un cambio brusco de una ración forrajera a otra rica en concentrado, a razón de 2,5 kg de concentrado al día, y con 12 horas de ayuno diario, causó trastornos digestivos en un 83% de los animales, tras una media de 7 días.
4. La adición de un cultivo de levaduras no previno la aparición de trastornos digestivos ante dicho protocolo de inducción, aunque si pareció reducir la capacidad espumante del líquido ruminal.
5. Cuando terneros de engorde fueron alimentados con una dieta a libre elección que incluía cebada, estos fueron capaces de aumentar gradualmente su inclusión en la dieta mediante cambios en la conducta de alimentación, sin mostrar signos de trastorno digestivo.
6. Terneros de engorde alimentados con cebada y ensilado de maíz a libre disposición, seleccionaron una dieta de composición similar al TMR convencional, sin mostrar grandes diferencias en el pH o el perfil de fermentación ruminal.

Estos resultados permiten concluir que la adición de levaduras, bajo las circunstancias de nuestros estudios, muestra efectos moderados a la hora de prevenir la aparición de trastornos digestivos. Estrategias a nivel de manejo de la alimentación, sin embargo, pueden resultar tanto o más determinantes en el control del pH ruminal.



## **CAPÍTULO VIII**

### **Anexos**





## ANEXO 1 – Resumen de los resultados descritos en los estudios con levaduras

**Tabla 1.** Efectos de las levaduras vivas sobre parámetros productivos, digestibilidad de los alimentos y poblaciones microbianas del rumen. Resultados expresados como % de variación respecto su control.

Autor, año	Animal <sup>1</sup>	PV	IMS	Leche <sup>2</sup>				Digestibilidad <sup>3</sup>					Población ruminal <sup>4</sup>				
				Prod	G	P	L	MS	FND	PB	CL	HCL	Total	Celulo	Proteo	Protz	
Arcos García y col., 2002	O		18,4					2,6	-17,7								43,6
Cabrera y col., 2000	T	0,8							2,1								
Desnoyers y col., 2009	C																
Doreau y Jouany, 1998	V		-4,2					1,5	1,5								21,2
Erasmus y col., 1992	V		6,4	6,4	0	0,9		-0,1	0,2	2,8					-5,5		
Giger-Reverdin y col., 1996	V		-3,8	-6,7	-14,1	6,7	-0,8			3,2							
Guedes y col., 2008	V								23,9								
Kamalamma y col., 1996	V	-0,6	0	-0,2	0	0	0		-4,1								
Kawas y col., 2007	O	3,6	-8,6					-2,7	-6,2								
Kung y col., 1997	V	-10,4	0	1,5	6,4	3,1											
Lascano y Heinrichs, 2009	T							-1,31									
Lascano y col., 2009	T	0	0,16					1,79	5,53								
Marden y col., 2008	V							8,48	40,5								
Miranda y col., 1996	T								6,4								51,4
Mpofu y Ndlovu, 1994	T		5,9						17,1								
Pinos Rodríguez y col., 2008	T	1,18	8,19														
Plata y col., 1994	T		1						24,3								34,5
Putnam y col., 1997	V		3,8	0,9	0	0											
Quigley y col., 1992	V	1,9	3,9														
Roa y col., 1997	T							8,2	-9,6	-1,2							
Soder y Holden, 1999	V	2,1	4,1	3,7	2,6	-1,6											
Throne y col., 2009	V		-1,2														
Williams y col., 1991	V		13,3	17,6	-5,5	4,1	0										
Wohlt y col., 1991	V	-2,3	9,2	4,6	-1,3	-3,4		0,6	0,4	2,2	8,7	-0,2					
Yoon y Stern, 1996	V		-6,4					2,8		1,9							
MEDIA		-0,4	2,8	3,5	-1,5	1,2	-0,3	2,2	6,0	1,8	8,7	-0,2		-5,5			37,7

<sup>1</sup> O=Oveja, T=Ternera, C=Cordero, V=Vaca lechera. PV=Peso vivo. IMS=Ingesta de materia seca. <sup>2</sup> Prod=Kg de leche al día, G=% de grasa en la leche, P=% de proteína en la leche, L=% de lactosa. <sup>3</sup> MS=Materia seca, FND=Fibra neutro detergente, PB=Proteína bruta, CL=Celulosa, HCL=Hemicelulosa.

<sup>4</sup> Celulo=Bacterias celulolíticas y Protz=Protozoos.

**Tabla 2.** Efectos de las levaduras vivas sobre el pH, los ácidos grasos y la concentración de N amoniacal en el rumen. Resultados expresados como % de variación respecto su control.

Autor, año	Animal <sup>1</sup>	pH	Ácidos grasos volátiles <sup>2</sup>					Lactato	NH <sub>3</sub>	
			Total	Ace	Pro	A:P	Bu			
Arcos García y col., 2002	O	-1,5	10,6	1,1	-8,1	11,1	8,9		1,5	
Cabrera y col., 2000	T									
Desnoyers y col., 2009	C	-0,3								
Doreau y Jouany, 1998	V	1,2	1,4	1,4	-0,8		-3,6		16	
Erasmus y col., 1992	V	0,2		-4,3	6,7	-11	6,2	-6,7	-14	-10
Giger-Reverdin y col., 1996	V									
Guedes y col., 2008	V	5,8	16,6	9	36	-21,1	11,6		-20	23,8
Kamalamma y col., 1996	V									
Kawas y col., 2007	O	6,3	2	18,1	-9,7	30	-41,7			
Kung y col., 1997	V	0,8	0,6	-1,8	0,4		0	0		24,5
Lascano y Heinrichs, 2009	T	-0,3	8,6	1,39	0,94	0,31	-10,1	5,9		-40,5
Lascano y col., 2009	T									
Marden y col., 2008	V	3,4	16,5	11,1	43,3		-3,77		-67,3	
Miranda y col., 1996	T	1,4	0,2	0,6	-1,3		-0,8			-8,4
Mpofu y Ndlovu, 1994	T									-4,9
Pinos Rodríguez y col., 2008	T	-3,6	38,2	0,18		21,4				53,8
Plata y col., 1994	T	1,9	8,4	-3,8	7,3		3,7			
Putnam y col., 1997	V	0		-5,9	5,6	-10,5	-3,7	-20,9	0	1,6
Quigley y col., 1992	V	0	3,1	8,1	-26,9		28,2	28,6	-21,6	11,6
Roa y col., 1997	T	7,3	18,7	22,3	27		-7,9			31
Soder y Holden, 1999	V									
Throne y col., 2009	V	3,3	-12	-0,74	-0,55	0,53	7,2	-3,5		5,9
Williams y col., 1991	V					-15,2			-59,7	
Wohlt y col., 1991	V									
Yoon y Stern, 1996	V	0,3	-3,6	0,6	-1,5	2,5	-1,6	3,6		16,3
MEDIA		1,5	7,8	3,6	5,2	0,8	-0,5	1,0	-30,4	8,7

<sup>1</sup> O=Oveja, T=Ternera, C=Cordero, V=Vaca lechera. pH=pH ruminal. <sup>2</sup> Total=Ácidos grasos volátiles totales, Ace=Acético, Pro=Propiónico, A:P=Ratio acético/propiónico, Bu=Butírico, Ramif.=Ramificados. NH<sub>3</sub>= Concentración de N amoniacal.

**Tabla 3.** Efectos del cultivo de levaduras sobre parámetros productivos, digestibilidad de los alimentos y poblaciones microbianas del rumen. Resultados expresados como % de variación respecto su control.

Autor, año	Animal <sup>1</sup>	PV	IMS	Leche <sup>2</sup>				Digestibilidad <sup>3</sup>					Población ruminal <sup>4</sup>					
				Prod	G	P	L	MS	FND	PB	CL	HCL	Total	Celulo	Proteo	Protz		
Arakaki y col., 2000	Z																	0
Arambel y Kent, 1990	V	4,4	-0,5	-3,7	1,2	-1,0	-2,0		-11,8	-0,4								
Cole y col., 1992	T+C		-4,3					4,3										
Dann y col., 2000	V	4	14,7	2,62	3,9	3,8	1,2											
Enjalbert y col., 1999	V							2,5	3,3									
Erasmus y col., 2005	V	1,9	-2,3	4,4	5,1	3,6	5,8											
Erdman y Sharma, 1989	V	-0,5	-3,1	-2,7	1,2	1,7												
Haddad y Goussous, 2005	C	8,1	6,2					7	7,7	11								
Harris y col., 1992	V	-2,2	4,1	4,7	-1,5	-2,9		1,5	-8,5	1,1								
Harrison y col., 1988	V							-7,8	-17,6			-11	2	13,5				
Hristov y col., 2010	V	-0,62	0,73	-0,2	-6,03	-0,34	0											14,1
Leismeister y col., 2004	T	8,5	9,9															
Longuski y col., 2009	V		0,73	-0,9	-0,6	0	-0,6											
Magalhaes y col., 2008	T	0,39	-1,8															
Olson y col., 1994	T	2	10,2					5,4	2,7	3,4								
Robinson, 1997	V	0,8	-1,6	1,6	5,8	1,9	5,3											
Robinson y Garrett, 1999	V	3,4	7,4	9,7	3,1	5,1	10											
Schingoethe y col., 2004	V	-2,1	-4,3	1,4	2,1	0,7	-0,6											
Wang y col., 2001	V	1,1	5,6	9,4	4,5	-1,0												
Wiedmeier y col., 1987	V							2,7		3,4		5,5	30	59,2				
Yoon y Stern, 1996	V		-6,4							9				28,9	54,5	0		
<b>MEDIA</b>		<b>2,1</b>	<b>2,1</b>	<b>2,4</b>	<b>1,7</b>	<b>1,1</b>	<b>2,4</b>	<b>2,2</b>	<b>-4,0</b>	<b>4,6</b>		<b>-2,7</b>	<b>16,0</b>	<b>33,9</b>	<b>54,5</b>	<b>4,7</b>		

<sup>1</sup> Z= Zebú, V=Vaca lechera, T=Tertera, C=Cordero. PV=Peso vivo. IMS=Ingesta de materia seca. <sup>2</sup> Prod=Kg de leche al día, G=% de grasa en la leche, P=% de proteína en la leche, L=% de lactosa. <sup>3</sup> MS=Materia seca, FND=Fibra neutro detergente, PB=Proteína bruta, CL=Celulosa, HCL=Hemicelulosa. <sup>4</sup> Celulo=Bacterias celulolíticas y Protz=Protozoos.

**Tabla 4.** Efectos del cultivo de levaduras sobre el pH, los ácidos grasos y la concentración de N amoniacal en el rumen. Resultados expresados como % de variación respecto su control.

Autor, año	Animal <sup>1</sup>	pH	Ácidos grasos volátiles <sup>2</sup>						Lactato	NH <sub>3</sub>
			Total	Ace	Pro	A:P	Bu	Ramif.		
Arakaki y col., 2000	Z									
Arambel y Kent, 1990	V									
Cole y col., 1992	T+C									
Dann y col., 2000	V									
Enjalbert y col., 1999	V	3,2	3,2	1,3	6	-0,7	-11,2	3,8		-19,9
Erasmus y col., 2005	V	-1,7		3,2	18,6	-10,6	7,2	0		-16,8
Erdman y Sharma, 1989	V									
Haddad y Goussous, 2005	C									
Harris y col., 1992	V									
Harrison y col., 1988	V	-4,3	7,1	-9,2	9,5	-17,5	-1,4	46,0		-30,4
Hristov y col., 2010	V	-1,2	0,3	-1,2	6,1	-1,94	-5,1	0,6		-16,7
Leismeister y col., 2004	T									
Longuski y col., 2009	V	0	1,36	1,07	-2,3	2,7	8,6	4,85	-2,8	13,5
Magalhaes y col., 2008	T									
Olson y col., 1994	T	0	-5,1	1,3	-4,7		-6,2			-27,9
Robinson, 1997	V									
Robinson y Garrett, 1999	V	0,8	0	1,23	-9,8	12,1	13,3	8,3		17,8
Schingoethe y col., 2004	V									
Wang y col., 2001	V									
Wiedmeier y col., 1987	V	0	2,8	-0,7	-1,4	2,42	4,8	4,9		2,8
Yoon y Stern, 1996	V	0,3	-3,6	0,6	-1,5	2,5	1,6	3,6		16,3
MEDIA		-0,3	0,8	-0,3	2,3	-1,4	1,3	9,0	-2,8	-6,8

<sup>1</sup> Z= Zebú, V=Vaca lechera, T=Ternera, C=Cordero. pH=pH ruminal. <sup>2</sup> Total=Ácidos grasos volátiles totales, Ace=Acético, Pro=Propiónico, A:P=Ratio acético/propiónico, Bu=Butírico, Ramif.=Ramificados. NH<sub>3</sub>= Concentración de N amoniacal.

**Referencias bibliográficas del ANEXO 1**

- Arakaki, L. C., R. C. Stahringer, J. E. Garrett, y B. A. Dehority. 2000. The effects of feeding monensin and yeast culture, alone or in combination, on the concentration and generic composition of rumen protozoa in steers fed on low-quality pasture supplemented with increasing levels of concentrate. *Anim. Feed Sci. Technol.* 84:121-127.
- Arambel, M. J. y B. A. Kent. 1990. Effect of yeast culture on nutrient digestibility and milk yield response in early- to mid- lactation dairy cows. *J. Dairy Sci.* 73:1560-1563.
- Arcos García, J. L., F. A. Castrejón, G. D. Mendoza, y E. P. Pérez Gavilán. 2000. Effect of two commercial yeast cultures with *Saccharomyces cerevisiae* on ruminal fermentation and digestion in sheep fed sugar cane tops. *Livest. Prod. Sci.* 63:153-157.
- Cabrera, E. J. I., M. G. D. Mendoza, I. E. Aranda, C. García Bojalil, G. R. Bárcena, y J. J. A. Ramos. 2000. *Saccharomyces cerevisiae* and nitrogenous supplementation in growing steers grazing tropical pastures. *Anim. Feed Sci. Technol.* 83:49-55.
- Cole, N. A., C. W. Purdy, y D. P. Hutcheson. 1992. Influence of yeast culture on feeder calves and lambs. *J. Anim. Sci.* 70:1682-1690.
- Dann, H. M., J. K. Drackley, G. C. McCoy, M. F. Hutjens, y J. E. Garrett. 2000. Effects of yeast culture (*Saccharomyces cerevisiae*) on prepartum intake and postpartum intake and milk production of Jersey cows. *J. Dairy Sci.* 83:123-127.
- Desnoyers, M., S. Giger-Reverdin, D. Sauvant, G. Bertin y C. Duvaux-Ponter. 2009. The influence of acidosis and live yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) supplementation on time-budget and feeding behaviour of dairy goats receiving two diets of differing concentrate proportion. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 121:108-119.
- Doreau, M. y J. P. Jouany. 1998. Effect of a *Saccharomyces cerevisiae* culture on nutrient digestion in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 81:3214-3221.
- Enjalbert, F., J. E. Garrett, R. Moncoulon, C. Bayourthe, y P. Chicoteau. 1999. Effects of yeast culture (*Saccharomyces cerevisiae*) on ruminal digestion in non-lactating dairy cows. *Anim. Feed Sci. and Technol.* 76:195-206.
- Erasmus, L. J., P. M. Botha, y A. Kistner. 1992. Effect of yeast culture supplement on production, rumen fermentation, and duodenal nitrogen flow in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 75:3056-3065.
- Erasmus, L. J., P. H. Robinson, A. Ahmadi, R. Hinders, y J. E. Garrett. 2005. Influence of prepartum and postpartum supplementation of a yeast culture and monensin, or both, on ruminal fermentation and performance of multiparous dairy cows. *Anim. Feed Sci. Technol.* 122:219-239.
- Erdman, R. A. y B. K. Sharma. 1989. Effect of yeast culture and sodium bicarbonate on milk yield and composition in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 72:1929-1932.

- Giger-Reverdin, S., N. Bezault, D. Sauvant y G. Bertin. 1996. Effects of a probiotic yeast in lactating ruminants: interaction with dietary nitrogen level. *Anim. Feed Sci. Technol.* 63:149-162.
- Guedes, C. M., D. Gonçalves, M. A. M. Rodrigues y A. Dias da Silva. 2008. Effects of a *Saccharomyces cerevisiae* yeast on ruminal fermentation and fibre degradation of maize silages in cows. *Anim. Feed Sci. Technol.* 145:27-40.
- Haddad, S. G. y S. N. Goussous. 2005. Effect of yeast culture supplementation on nutrient intake, digestibility and growth performance of Awassi lambs. *Anim. Feed Sci. Technol.* 118:343-348.
- Harris, B., Jr., D. E. Dorminey, W. A. Smith, H. H. Van Horn, y C. J. Wilcox. 1992. Effects of feather meal at two protein concentrations and yeast culture on production parameters in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 75:3524-3530.
- Harrison, G. A., R. W. Hemken, K. A. Dawson, R. J. Harmon, y K. B. Barker. 1988. Influence of addition of yeast culture supplement to diets of lactating cows on ruminal fermentation and microbial-populations. *J. Dairy Sci.* 71:2967-2975.
- Hristov, A. N., G. Varga, T. Cassidy, M. Long, K. Heyler, S. K. R. Karnati, B. Corl, C. J. Hovde y I. Yoon. 2010. Effect of *Saccharomyces cerevisiae* fermentation product on ruminal fermentation and nutrient utilization in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 93:682-692.
- Kamalamma, U. Krishnamoorthy, y P. Krishnappa. 1996. Effect of feeding yeast culture (Yea-sacc(1026)) on rumen fermentation in vitro and production performance in crossbred dairy cows. *Anim. Feed Sci. Technol.* 57:247-256.
- Kawas, J. R., R. García Castillo, H. Fimbres Durazo, F. Garza Cazares, J. F. G. Hernandez Vidal, E. Olivares Saenz, y C. D. Lu. 2007. Effects of sodium bicarbonate and yeast on nutrient intake, digestibility, and ruminal fermentation of light-weight lambs fed finishing diets. *Small Ruminant Research* 67:149-156.
- Kung, L., Jr., E. M. Kreck, R. S. Tung, A. O. Hession, A. C. Sheperd, M. A. Cohen, H. E. Swain, y J. A. Leedle. 1997. Effects of a live yeast culture and enzymes on in vitro ruminal fermentation and milk production of dairy cows. *J. Dairy Sci.* 80:2045-2051.
- Lascano, G. J. y A. J. Heinrichs. 2009. Rumen fermentation pattern of dairy heifers fed restricted amounts of low, medium, and high concentrate diets without and with yeast culture. *Livest. Sci.* 124:48-57.
- Lascano, G. J., G. I. Zanton, F. X. Suárez Mena y A. J. Heinrichs. 2009. Effect of limit feeding high- and low-concentrate diets with *Saccharomyces cerevisiae* on digestibility and on dairy heifer growth and first-lactation performance. *J. Dairy Sci.* 92:5100-5110.
- Leismeister, K. E., A. J. Heinrichs, y M. T. Gabler. 2004. Effects of supplemental yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) culture on rumen development, growth characteristics, and blood parameters in neonatal dairy calves. *J. Dairy Sci.* 87:1832-1839.

- Longuski, R. A., Y. Ying y M. S. Allen. 2009. Yeast culture supplementation prevented milk fat depression by a short-term dietary challenge with fermentable starch. *J. Dairy Sci.* 92:160-167.
- Magalhaes, V. J. A., F. Susca, F. S. Lima, A. F. Branco, I. Yoon y J. E. P. Santos. 2008. Effect of feeding yeast culture on performance, health, and immunocompetence of dairy calves. *J. Dairy Sci.* 91:1497-1509.
- Marden, J. P., C. Julien, V. Monteils, E. Auclair, R. Moncoulon y C. Bayourthe. 2008. How does live yeast differ from sodium bicarbonate to stabilize ruminal pH in high-yielding dairy cows?. *J. Dairy Sci.* 91:3528-3535.
- Miranda, R. L. A., M. G. D. Mendoza, J. R. Bárcena Gama, M. S. S. González, R. Ferrara, C. M. E. Ortega, y P. M. A. Cobos. 1996. Effect of *Saccharomyces cerevisiae* or *Aspergillus oryzae* cultures and NDF level on parameters of ruminal fermentation. *Anim. Feed Sci. Technol.* 63:289-296.
- Mpofu, I. D. T. y L. R. Ndlovu. 1994. The potential of yeast and natural fungi for enhancing fibre digestibility of forages and roughages. *Anim. Feed Sci. Technol.* 48:39-47.
- Olson, K. C., J. S. Caton, D. R. Kirby, y P. L. Norton. 1994. Influence of yeast culture supplementation and advancing season on steers grazing mixed-grass prairie in the northern Great Plains: II. Ruminal fermentation, site of digestion, and microbial efficiency. *J. Anim. Sci.* 72:2158-2170.
- Pinos Rodríguez, J.M., P. H. Robinson, M.E. Ortega, S.L. Berry, G. Mendoza y R. Bárcena. 2008. Performance and rumen fermentation of dairy calves supplemented with *Saccharomyces cerevisiae*<sup>1077</sup> or *Saccharomyces boulardii*<sup>1079</sup>. *Anim. Feed Sci. Technol.* 140:223-232.
- Plata, F., G. D. Mendoza, J. R. Bárcena-Gama, y S. González. 1994. Effect of a yeast culture (*Saccharomyces cerevisiae*) on neutral detergent fiber digestion in steers fed oat straw based diet. *Anim. Feed Sci. Technol.* 49:203-210.
- Putnam, D. E., C. G. Schwab, M. T. Socha, N. L. Whitehouse, N. A. Kierstead, y B. D. Garthwaite. 1997. Effect of yeast culture in the diets of early lactation dairy cows on ruminal fermentation and passage of nitrogen fractions and amino acids to the small intestine. *J. Dairy Sci.* 80:374-384.
- Quigley, J. D., III, L. B. Wallis, H. H. Dowlen, y R. N. Heitmann. 1992. Sodium bicarbonate and yeast culture effects on ruminal fermentation, growth, and intake in dairy calves. *J. Dairy Sci.* 75:3531-3538.
- Roa, V., J. R. Bárcena Gama, M. González, M. Mendoza, C. Ortega, y B. García. 1997. Effect of fiber source and a yeast culture (*Saccharomyces cerevisiae* 1026) on digestion and the environment in the rumen of cattle. *Anim. Feed Sci. Technol.* 64:327-336.
- Robinson, P. H. 1997. Effect of yeast culture (*Saccharomyces cerevisiae*) on adaptation of cows to diets postpartum. *J. Dairy Sci.* 80:1119-1125.
- Robinson, P. H. y J. E. Garrett. 1999. Effect of yeast culture (*Saccharomyces cerevisiae*) on adaptation of cows to postpartum diets and on lactational performance. *J. Anim. Sci.* 77:988-999.



- Schingoethe, D. J., K. N. Linke, K. F. Kalscheur, A. R. Hippen, D. R. Rennich, y I. Yoon. 2004. Feed efficiency of mid-lactation dairy cows fed yeast culture during summer. *J. Dairy Sci.* 87:4178-4181.
- Soder, K. J. y L. A. Holden. 1999. Dry matter intake and milk yield and composition of cows fed yeast prepartum and postpartum. *J. Dairy Sci.* 82:605-610.
- Throne, M., A. Bach, M. Ruíz Moreno, M. D. Stern, J. G. Linn. 2009. Effects of *Saccharomyces cerevisiae* on ruminal pH and microbial fermentation in dairy cows. Yeast supplementation on rumen fermentation. *Livest. Sci.* 124:261-265.
- Wang, Z., M. L. Eastridge, y X. Qiu. 2001. Effects of forage neutral detergent fiber and yeast culture on performance of cows during early lactation. *J. Dairy Sci.* 84:204-212.
- Wiedmeier, R. D., M. J. Arambel, y J. L. Walters. 1987. Effect of yeast culture and *Aspergillus oryzae* fermentation extract on ruminal characteristics and nutrient digestibility. *J. Dairy Sci.* 70:2063-2068.
- Williams, P. E., C. A. Tait, G. M. Innes, y C. J. Newbold. 1991. Effects of the inclusion of yeast culture (*Saccharomyces cerevisiae* plus growth medium) in the diet of dairy cows on milk yield and forage degradation and fermentation patterns in the rumen of steers. *J. Anim. Sci.* 69:3016-3026.
- Wohlt, J. E., A. D. Finkelstein, y C. H. Chung. 1991. Yeast culture to improve intake, nutrient digestibility, and performance by dairy cattle during early lactation. *J. Dairy Sci.* 74:1395-1400.
- Yoon, I. K. y M. D. Stern. 1996. Effects of *Saccharomyces cerevisiae* and *Aspergillus oryzae* cultures on ruminal fermentation in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 79:411-417.





## ANEXO 2 – Marco en el que se origina la presente tesis doctoral

**Tabla 1.** Resumen cronológico de los experimentos realizados en el departamento de Ciencia Animal y de los Alimentos dentro de la línea de investigación de aditivos modificadores de la fermentación ruminal.

Año	Autores	Título del estudio	Publicación
2004	Molero y col.	Effects of a specific blend of essential oil compounds on dry matter and crude protein degradability in heifers fed diets with different forage to concentrate ratios.	Anim. Feed Sci. Technol.
	Cardozo y col.	Effects of natural plant extracts on ruminal protein degradation and fermentation profiles in continuous culture	J. Anim. Sci.
2005	Castillejos y col.	Effects of a specific blend of essential oil compounds and the type of diet on rumen microbial fermentation and nutrient flow from a continuous culture system	Anim. Feed Sci. Technol.
	Busquet y col.	Effects of cinnamaldehyde and garlic oil on rumen microbial fermentation in a dual flow continuous culture	J. Dairy Sci.
	Cardozo y col.	Screening for the effects of natural plant extracts at different pH on in vitro rumen microbial fermentation of a high-concentrate diet for beef cattle	J. Anim. Sci.
	Busquet y col.	Screening for effects of plant extracts and active compounds of plants on dairy cattle rumen microbial fermentation in a continuous culture system	Anim. Feed Sci. Technol.
	Busquet y col.	Effect of garlic oil and four of its compounds on rumen microbial fermentation	J. Dairy Sci.
2006	Busquet y col.	Plant extracts affect in vitro rumen microbial fermentation	J. Dairy Sci.
	Castillejos y col.	Effect of essential oil active compounds on rumen microbial fermentation and nutrient flow in in vitro systems	J. Dairy Sci.
	Cardozo y col.	Effects of alfalfa extract, anise, capsicum, and a mixture of cinnamaldehyde and eugenol on ruminal fermentation and protein degradation in beef heifers fed a high-concentrate diet	J. Anim. Sci.
2007	Castillejos y col.	Effects of dose and adaptation time of a specific blend of essential oil compounds on rumen fermentation	Anim. Feed Sci. Technol.
	Calsamiglia y col.	Essential oils as modifiers of rumen microbial fermentation	J. Dairy Sci.
2008	Fandiño y col.	Anise and capsicum as alternatives to monensin to modify rumen fermentation in beef heifers fed a high concentrate diet	Anim. Feed Sci. Technol.
	Castillejos y col.	In vitro evaluation of effects of ten essential oils at three doses on ruminal fermentation of high concentrate feedlot-type diets	Anim. Feed Sci. Technol.
	Lourenço y col.	Effects of saponins, quercetin, eugenol, and cinnamaldehyde on fatty acid biohydrogenation of forage polyunsaturated fatty acids in dual-flow continuous culture fermenters	J. Anim. Sci.
2009	Blanch y col.	Physiological changes in rumen fermentation during acidosis induction and its control using a multivalent polyclonal antibody preparation in heifers	J. Anim. Sci.
2010	Blanch y col.	Effects of acarbose on ruminal fermentation, blood metabolites and microbial profile involved in ruminal acidosis in lactating cows fed a high-carbohydrate ration	J. Dairy Res.

**Tabla 2.** Resumen cronológico de los experimentos realizados en el departamento de Ciencia Animal y de los Alimentos dentro de la línea de investigación del pH ruminal.

Año	Autores	Título del estudio	Publicación
2002	Calsamiglia y col.	Effects of pH and pH fluctuations on microbial fermentation and nutrient flow from a dual-flow continuous culture system.	J. Dairy Sci.
2007	Cerrato y col.	Effects of time at suboptimal pH on rumen fermentation in a dual-flow continuous culture system	J. Dairy Sci.
	Cerrato y col.	Effects of patterns of suboptimal pH on rumen fermentation in a dual-flow continuous culture system	J. Dairy Sci.
	Robles y col.	Effects of feeding frequency on intake, ruminal fermentation, and feeding behavior in heifers fed high-concentrate diets	J. Anim. Sci.
2008	Calsamiglia y col.	Changes in rumen microbial fermentation are due to a combined effect of type of diet and pH	J. Anim. Sci.
	Cerrato y col.	Effect of the magnitude of the decrease of rumen pH on rumen fermentation in a dual-flow continuous culture system	J. Anim. Sci.
	González y col.	Increasing sodium bicarbonate level in high-concentrate diets for heifers. 1. Effects on intake, water consumption and ruminal fermentation	Animal
	González y col.	Effect of the number of concentrate feeding places per pen on performance, behavior, and welfare indicators of Friesian calves during the first month after arrival at the feedlot	J. Anim. Sci.
2009	González y col.	Intake, water consumption, ruminal fermentation, and stress response of beef heifers fed after different lengths of delays in the daily feed delivery time	J. Anim. Sci.





**ANEXO 3**

CAA/TA/0038-00 Determinación del poder espumante del líquido ruminal



