



## Evaluación de métodos nutricionales para reactivar inóculo ruminal preservado analizado a través de cinética de fermentación y digestibilidad de forrajes *in vitro*



María G. Domínguez-Ordóñez <sup>a</sup>

Luis A. Miranda-Romero <sup>a</sup>

Pedro A. Martínez-Hernández <sup>a</sup>

Maximino Huerta-Bravo <sup>a</sup>

Ezequias Castillo-Lopez <sup>b\*</sup>

<sup>a</sup> Universidad Autónoma Chapingo. Departamento de Zootecnia, 56220. Texcoco, Estado de México, México.

<sup>b</sup> Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Medicina Veterinaria y Zootecnia. Cuautitlán, Estado de México, México.

\*Autor de correspondencia: ezequias@huskers.unl.edu

### Resumen:

Se evaluó el efecto del medio de cultivo y tiempo de pre-incubación para reactivar inóculo ruminal preservado, evaluando parámetros de la cinética de fermentación y digestibilidad *in vitro* de materia seca (DIVMS). En el primer experimento, los tratamientos fueron 1) CONTROL, líquido ruminal fresco; 2) BAJO24, inóculo reactivado pre-incubándolo durante 24 h en una solución base; 3) MODE24, inóculo reactivado pre-incubándolo durante 24 h en una solución base, extracto de levaduras y peptona de caseína; y 4) ALTO24, inóculo reactivado pre-incubándolo durante 24 h en una solución base, extracto de levaduras, peptona de caseína y carbohidratos. En el segundo experimento, los tratamientos fueron 1) CONTROL, líquido ruminal fresco, y 2) ALTO12, similar a ALTO24, pero el inóculo fue pre-incubado durante 12 h. Se realizaron tres réplicas. Se midió el volumen máximo de gas ( $V_m$ ), la fase lag ( $L$ ), la tasa de producción de gas ( $S$ ) y DIVMS usando cuatro substratos. Se analizaron los efectos principales de inóculos y substratos e interacciones. Comparado con el CONTROL, la preservación del inóculo afectó ( $P<0.01$ )  $V_m$ ,  $L$  y  $S$ . Sin embargo, ALTO24 mejoró ( $P<0.01$ ) la cinética de fermentación y DIVMS comparado con el tratamiento MODE24 o BAJO24. En el segundo experimento, DIVMS fue menor ( $P<0.01$ ) para el tratamiento ALTO12 a las 72

h de fermentación comparado con el CONTROL. La alfalfa y el pasto ovilla tuvieron mayor ( $P<0.01$ )  $Vm$  y DIVMS comparado con el cocuite y el pasto de Guinea. La reactivación del inóculo ruminal preservado por pre-incubación durante 24 h en medio que contiene extracto de levaduras, peptona de caseína y carbohidratos tuvo un desempeño mejor que la pre-incubación por 12 h; sin embargo, la cinética de fermentación y DIVMS no fueron comparables al líquido ruminal fresco.

**Palabras clave:** Digestibilidad del forraje, Fermentación, Preservación, Inóculo ruminal.

Recibido: 09/05/2017

Aceptado: 08/03/2018

## Introducción

Las técnicas *in vitro* se usan comúnmente para evaluar la fermentación y la digestibilidad de los ingredientes de los alimentos utilizados en las raciones de rumiantes<sup>(1,2,3)</sup>. Sin embargo, la necesidad de animales fistulados para la recolección de líquido ruminal es una limitación importante de estas técnicas<sup>(4,5,6)</sup>. Por lo tanto, la preservación del fluido ruminal podría superar esta limitación, ya que permite el uso del inóculo sin tener que mantener animales donantes<sup>(7,8,9)</sup>. Esto se lleva a cabo utilizando glicerol para minimizar el daño celular microbiano<sup>(10,11,12)</sup> y mantener la comunidad microbiana<sup>(13,14)</sup>.

La reactivación apropiada del inóculo conservado antes de ser utilizado sigue siendo, en gran parte, desconocida. El líquido ruminal liofilizado subestima la fermentación *in vitro* y la digestibilidad de la materia seca, en comparación con el líquido ruminal fresco cuando se reconstituye en el *buffer* de McDougall<sup>(8)</sup>. La depresión en los parámetros de fermentación<sup>(15)</sup> presumiblemente debido al daño celular<sup>(8,9)</sup> o la muerte microbiana<sup>(9)</sup> puede explicar esta subestimación. Además, las limitaciones en la disponibilidad de nutrientes como el nitrógeno<sup>(16,17)</sup> y los carbohidratos<sup>(18,19,20)</sup> pueden influir en la reactivación, el crecimiento y la actividad de los microbios ruminales. Por lo tanto, recientemente, se ha reconocido que la reactivación de bacterias conservadas es un paso crítico para obtener microorganismos activos, y que las condiciones de reactivación deben optimizarse<sup>(21,22,23)</sup>.

Debido a la limitada información sobre estrategias para mejorar la reactivación del inóculo ruminal, se requiere realizar investigación para encontrar un enfoque rentable y práctico. Por lo tanto, los objetivos de este estudio consistieron en evaluar los efectos del medio de cultivo utilizado y el tiempo de incubación necesario para la reactivación adecuada del inóculo ruminal liofilizado. Las variables de respuesta evaluadas se basaron en la cinética de fermentación *in vitro* y la digestibilidad de la materia seca de alfalfa, pasto ovilla, cocuite y pasto de Guinea. La hipótesis fue que no habría diferencias en la digestibilidad del forraje *in vitro* y la cinética de fermentación entre el inóculo ruminal fresco y el preservado.

## Material y métodos

Los experimentos se llevaron a cabo en la Universidad Autónoma Chapingo. Los animales utilizados en los experimentos se manejaron de acuerdo con las directrices y las regulaciones de la Universidad.

### Sustratos de fermentación y análisis químico

Se utilizaron cuatro especies de forraje comúnmente utilizadas para rumiantes de pastoreo en México como sustratos de fermentación (Cuadro 1): alfalfa (*Medicago sativa* L.) cv San Miguel, pasto ovilla (*Dactylis glomerata* L) cv Potomac, cocuite (*Gliricidia sepium* (Jacq.) Kunth ex Walp.) y pasto de Guinea (*Panicum maximum* Jacq.) cv Tanzania. La alfalfa, el pasto de Guinea y el pasto de ovilla se cortaron a 7 cm por encima del nivel del suelo; sólo las hojas de cocuite se recolectaron a mano de las ramas de varios árboles. Se reunió suficiente material para obtener al menos 1 kg de muestra (base DM) para cada especie de forraje. Las muestras recolectadas se secaron en un horno de aire forzado a 60 °C durante 96 h; se molieron a través de un tamiz de 1 mm (Wiley Mill, Arthur H. Thomas Co., Filadelfia, PA) y se analizaron para medir el contenido de proteína cruda, ceniza, extracto etéreo<sup>(24)</sup> (métodos # 976.06; # 942.05; # 920.39, respectivamente). La fibra detergente ácido (ADF)<sup>(25)</sup>, la fibra detergente neutro (NDF) se analizaron sin amilasa estable al calor y se expresaron con la inclusión de ceniza residual<sup>(25)</sup> y azúcares solubles<sup>(26)</sup>.

**Cuadro 1:** Composición química (g/kg MS) de especies forrajeras utilizadas como sustratos de fermentación

Especies forrajeras	Composición química (g/kg MS)					
	Proteína bruta	Ceniza	Extracto etéreo	FDA	FDN <sup>A</sup>	Azúcares
Alfalfa	206	119	11	350	442	41
Pasto ovilla	197	163	26	400	540	35
Cocuite	183	85	24	367	465	47
Pasto Guinea	65	123	5	564	779	29

FDA= fibra detergente ácida; FDN= fibra detergente neutra.

<sup>A</sup> Se ensayó fibra detergente neutra sin amilasa termoestable y expresada incluyendo ceniza residual.

### Recolección, conservación y reactivación de fluidos ruminales

Los procedimientos *in vitro* para cada experimento incluyeron tres repeticiones<sup>(27,28)</sup>. De manera similar a los estudios previos<sup>(29)</sup>, para cada ensayo *in vitro* se recolectó líquido ruminal fresco de tres carneros criollos adultos fistulados con un peso promedio de 53.0 kg. Los carneros donantes fueron alimentados con una dieta que contenía 80 % de forraje y 20 % de concentrado. Se ofreció alimentación a las 9:00 h y a las 15:00 h todos los días;

se permitió la ingesta *ad libitum*. Además, se dispuso de agua fresca y limpia *ad libitum*. Los carneros se equiparon con una cánula ruminal para recoger el fluido ruminal por succión<sup>(30)</sup>. El fluido ruminal recogido se filtró a través de cuatro capas de estopilla y se combinaron volúmenes iguales de fluido ruminal de cada donante para obtener una muestra representativa y evitar variaciones entre animales<sup>(31,32,33)</sup>.

Se incorporó 5% (v/v) de glicerol (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) para servir como crioprotector del inóculo ruminal<sup>(12,13)</sup>. Se colocaron alícuotas en recipientes de vidrio estériles de 10 ml. Los contenedores se cerraron herméticamente y se congelaron a -70 °C durante 3 días. La liofilización se realizó como se describió anteriormente<sup>(8)</sup> (Labconco Lymph Lock, modelo 195) al vacío (-0.133 mBar), y el inóculo se almacenó hasta su uso posterior. La reactivación del inóculo conservado se realizó mediante la reconstitución de muestras liofilizadas en una solución de cisteína a un volumen igual al del fluido ruminal filtrado original. Esta solución contenía 2.5 g de L-cisteína, 2.5 g de sulfito de sodio y 0.1 mL de resazurina (1%) disuelta en 15 mL de hidróxido de sodio (2N), se agregó agua destilada para hacer un volumen total de 100 mL (Cuadro 2), que sirvió como amortiguador y creó un entorno reducido en los medios, simulando las condiciones reducidas del rumen. El inóculo reconstituido se incubó a temperatura ambiente durante 10 min para permitir la rehidratación, el inóculo reconstituido se transfirió a 100 ml de medio de cultivo y luego se incubó previamente a 39 °C durante 24 o 12 h. El medio de cultivo utilizado y el tiempo de preincubación variaron según el experimento, como se describe a continuación.

**Cuadro 2:** Composición de los ingredientes de los tres medios de cultivo utilizados para la reactivación del inóculo ruminal liofilizado

Ingrediente del medio utilizado para la reactivación	Tipo de inóculo		
	BAJO 24	MODE 24	ALTO 24
	----- Cantidad por 100 mL -----		
Agua destilada, ml	50	50	50
Líquido ruminal <sup>A</sup> , ml	29	29	29
Solución de carbonato de sodio (8%), ml	5	5	5
Solución mineral I <sup>B</sup> , ml	7	7	7
Solución mineral II <sup>C</sup> , ml	7	7	7
Solución de cisteína <sup>D</sup> , ml	2	2	2
Solución de resazurina 1%, ml	0.10	0.10	0.10
Extracto de levadura, g	---	0.50	0.50
Peptona de caseína, g	---	0.50	0.50
Forraje molido <sup>E</sup> , g	0.25	0.25	0.25
Glucosa, g	---	---	0.30
Celobiosa, g	---	---	0.30
Almidón, g	---	---	0.25

<sup>A</sup>= colado a través de 4 capas de estopilla, centrifugado 2 veces a 13,416 ×g y esterilizado a 15 psi durante 15 min.

<sup>B</sup>= con 6.0 g de potasio hidrógeno fosfato por litro de agua destilada<sup>(44)</sup>.

<sup>C</sup>Con 6.0 g de fosfato de potasio monobásico, 6.0 g de sulfato de amonio, 12 g de cloruro de sodio, 2.45 g de monohidrato de sulfato de magnesio, y 1.6 g de monohidrato de cloruro de calcio por litro de agua destilada<sup>(44)</sup>.

<sup>D</sup>2.5 g de L-cisteína disueltos en 15 ml de hidróxido de sodio (2N), 2.5 g de sulfuro de sodio y 0,1 ml de rezaurina (1%); el volumen fue llevado a 100 ml; la solución se calentó y se esterilizó mediante autoclave.

<sup>E</sup>Pasto de Guinea molido.

## Inóculo ruminal evaluado

*Experimento 1.* Se evaluaron cuatro tipos de inóculo ruminal para las mediciones de cinética de fermentación y DIVMS. Se comparó un fluido ruminal fresco (control) con inóculos liofilizados reactivados por preincubación durante 24 h en 1 de 3 medios de cultivo (Cuadro 2). Específicamente, los tratamientos fueron 1) CONTROL, fluido ruminal fresco; 2) BAJO24, el inóculo se reactivó en un medio que contenía 100 ml de una solución de cultivo basal (compuesta de 50 % de agua destilada, 29 % de líquido ruminal clarificado, 14 % de soluciones minerales I y II, 5 % de carbonato de sodio, 2 % de solución de cisteína) y 0.1 % de rezaurina; 3) MODE24, el inóculo reactivado en un medio que contiene 100 ml de la solución de cultivo basal, rezaurina al 0.1 %, 0.5 g de extracto de levadura (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) y 0.5 g de peptona de caseína (Bioxon Becton Dickinson, México); y 4) ALTO24, el inóculo reactivado en un medio que contiene 100 ml de una solución de cultivo basal, 0.1% de rezaurina, 0.5 g de extracto de levadura (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), 0,5 g de peptona de caseína (Bioxon Becton Dickinson, México), 0.3 g de glucosa, 0.3 g de celobiosa y 0.25 g de almidón. Los medios también incluyeron 0.25 g de forraje de tierra sobre una base de DM (Cuadro 2).

*Experimento 2.* En el segundo experimento se compararon dos tipos de fluido ruminal: 1) CONTROL, fluido ruminal fresco, y 2) ALTO12, inóculo reactivado utilizando un medio descrito previamente para ALTO24. Sin embargo, en este experimento, el inóculo ruminal preservado se reactivó mediante preincubación durante solo 12 h en un intento de encontrar un enfoque más práctico y más rápido para el proceso de reactivación.

## Cinética de fermentación y DIVMS

En cada experimento, se combinaron inóculos ruminales frescos y reactivados con un agente diluyente que contenía las soluciones minerales reducidas I y II y la solución de cisteína<sup>(34)</sup> en una proporción de 1: 9 (v/v, fluido ruminal: agente de dilución, Cuadro 2). El CO<sub>2</sub> se agregó mientras se añadía el agente de dilución al fluido ruminal, que se mantuvo a 39 °C.

Posteriormente, se determinaron las cinéticas de fermentación y DIVMS de forraje combinando 90 ml de inóculo ruminal diluido con 0.5 g de sustrato de fermentación utilizando botellas de vidrio de 125 ml. La determinación de los parámetros de cinética

de fermentación se basó en el procedimiento utilizado para la medición de gas<sup>(35,36)</sup>. Específicamente, se registró la presión del gas (kg / cm<sup>2</sup>) a 1, 2, 4, 6, 10, 14, 18, 24, 30, 38, 48 y 72 h de incubación. Después de registrar este valor en cada punto de tiempo, la presión del gas se restableció a cero. Los valores de presión se convirtieron después en volumen de gas (ml / g de MS de sustrato); para hacerlo, primero se generó una curva estándar al inyectar volúmenes conocidos de CO<sub>2</sub>. La ecuación de esta curva estándar se generó agregando una línea de regresión lineal, y esta ecuación fue: volumen de gas (mL / g de sustrato) = presión (kg/cm<sup>2</sup>) \* 39.46 + 0, con un R<sup>2</sup> de 0.94. Esta curva estándar se generó a temperatura ambiente. El uso de esta técnica también ha sido registrado recientemente por otros investigadores<sup>(29)</sup>.

El volumen acumulado de gas en cada punto de tiempo se utilizó para estimar los parámetros de la cinética de fermentación: volumen máximo de gas (*V<sub>m</sub>*; mL / g), fase de retraso (*L*; h) y la tasa de producción de gas (*S*; h<sup>-1</sup>). Esto se realizó utilizando un modelo logístico descrito por Schofield *et al*<sup>(37)</sup>:

$$\text{Volumen de gas} = \frac{Vm}{1 + \exp(2 - 4 \times S \times (t - L))} \quad (\text{Ecuación 1})$$

Donde *V<sub>m</sub>* es el volumen máximo; *S* es la tasa de producción de gas; *t* es el punto temporal de la medición, y *L* es la fase de retraso. Además de los parámetros de cinética de fermentación, la DIVMS de los sustratos se determinó a las 24 y 72 h de fermentación (DIVMS 24 y DIVMS 72, respectivamente). En cada momento, el contenido de las botellas de fermentación correspondientes se filtró a través del papel filtro Whatman No. 4. El residuo se secó a 100 °C durante 12 h en un horno de aire forzado y se registró el peso seco. Posteriormente, se calculó la DIVMS en relación con la cantidad de muestra original utilizada.

### Análisis estadístico

Se utilizó el procedimiento GLM de SAS<sup>(38)</sup>. En cada experimento (n= 3), los valores medios dentro de cada sustrato de fermentación se consideraron como la unidad experimental. Dadas las condiciones experimentales controladas, se declaró un efecto significativo a *P* <0.01; este nivel de importancia también puede contribuir a reducir el riesgo de error de tipo I. Solo cuando la interacción de primer orden no fue significativa, la separación de medias para los efectos principales se llevó a cabo mediante la prueba de Tukey; de lo contrario, se realizó una separación de medias pareada mediante la prueba *t*. El parámetro de dispersión reportado es el error estándar más grande de la media (SEM).

Los datos del Exp 1 se analizaron como un diseño experimental completamente al azar con una disposición factorial de tratamientos 4×4 (4 tipos de inóculo y 4 sustratos de fermentación). Los datos del Exp 2 se analizaron de acuerdo con un diseño experimental completamente al azar con una disposición factorial de tratamientos 2×4 (2 tipos de inóculo y 4 sustratos de fermentación). En ambos experimentos se analizaron los efectos principales del tipo de inóculo y el sustrato de fermentación. También se evaluó la interacción del inóculo tipo × y el sustrato de fermentación. El modelo estadístico para los análisis fue:

$$Y_{ijk} = \mu + \tau_i + \beta_j + \tau\beta_{ij} + \varepsilon_{ijk}$$

**Donde:**

$Y_{ijk}$  representa la observación del tratamiento  $ijk$ ;

$\mu$  representa la media general;

$\tau_i$  representa el inóculo tipo  $i$ ;

$\beta_j$  representa el sustrato de fermentación  $j$ ;

$\tau\beta_{ij}$  representa el efecto de interacción del inóculo tipo  $i$  y el sustrato de fermentación  $j$ ;

El término residual  $\varepsilon_{ijk}$  se asumió como distribuido de forma normal, independiente e idéntica con varianza  $\sigma^2_e$ .

## Resultados

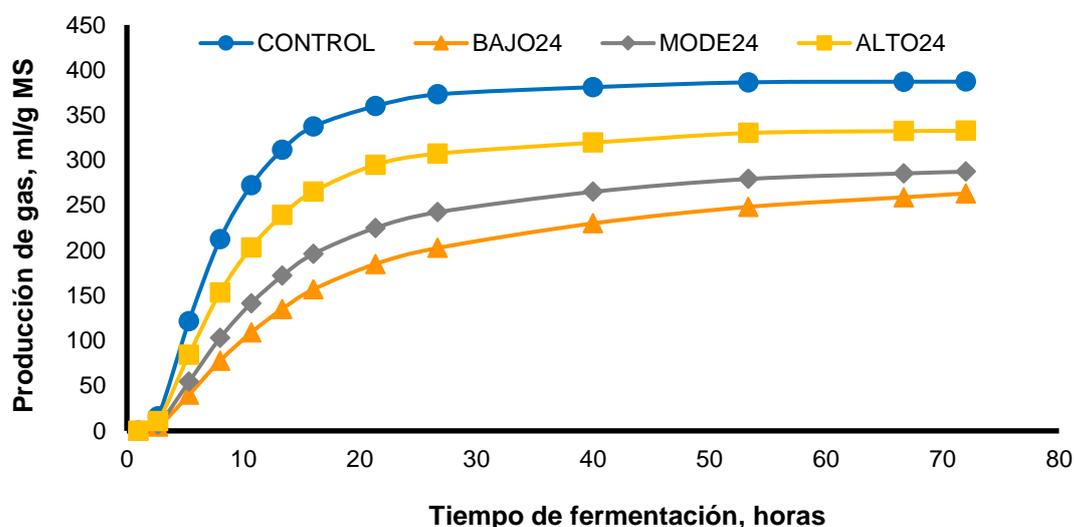
### Composición química de los forrajes utilizados como sustratos de fermentación

La composición química analizada de los cuatro forrajes utilizados se incluye en el Cuadro 1. El pasto de Guinea fue bajo en proteína cruda y alto en contenido de fibra (65.0 y 779.0 g / kg de MS para proteína cruda y NDF, respectivamente); mientras que la alfalfa fue alta en proteína y baja en contenido de fibra (206.0 y 442.0 g / kg de MS para proteína cruda y NDF, respectivamente); el valor de estos nutrientes en pasto de ovillo y el cocuite fue intermedio.

### Cinética de fermentación y DIVMS para inóculos reactivados por preincubación de 24 h

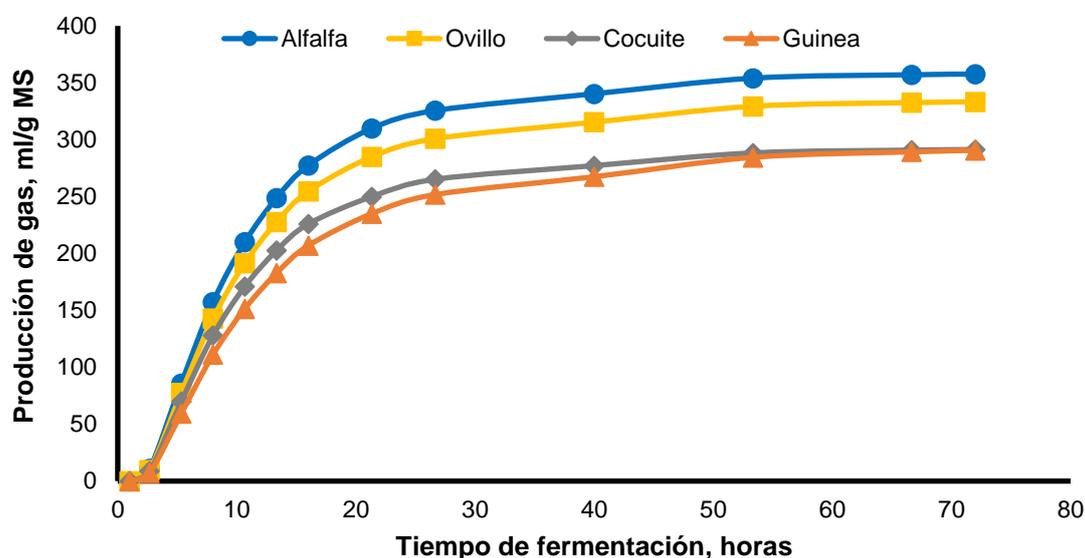
La Figura 1 ilustra la producción de gas *in vitro* para el CONTROL y los inóculos reactivados por preincubación durante 24 h. El CONTROL mostró la producción máxima y más rápida de gas en comparación con los otros tratamientos. Incluso con el tratamiento ALTO24, la fermentación se redujo en 50 %, aproximadamente, durante las primeras horas de incubación. Entre los inóculos preservados, ALTO24 registró la mayor producción de gas, seguido del tratamiento MODE24 y del BAJO24. La Figura 2 ilustra la producción de gas para cada sustrato de fermentación. La alfalfa tuvo la producción máxima y más rápida de gas en comparación con el resto de los forrajes. El pasto de ovillo tuvo valores intermedios para la producción de gas, y el cocuite y el pasto de Guinea, los valores más bajos.

**Figura 1:** Producción de gas *in vitro* para el control y los inóculos preservados y reactivados por pre-incubación durante 24 h en diferentes medios de cultivo.



CONTROL, líquido ruminal fresco; BAJO24, inóculo reactivado por pre-incubación durante 24 h en una solución de cultivo basal; MODE24, similar a BAJO24, pero incluye extracto de levadura y peptona de caseína; ALTO24, similar a MODE24, pero incluye carbohidratos. Testigo:  $V_m=387.15$  mL/g,  $L=4.06$  h,  $S=0.041$  h<sup>-1</sup>; BAJO24:  $V_m=266.11$  mL/g,  $L=13.70$  h,  $S=0.018$  h<sup>-1</sup>; MODE24:  $V_m=288.22$  mL/g,  $L=7.62$  h,  $S=0.023$  h<sup>-1</sup>; ALTO24:  $V_m=332.83$  mL/g,  $L=8.05$  h,  $S=0.32$  h<sup>-1</sup>.

**Figura 2.** Producción de gas *in vitro* de cuatro forrajes cuando se promediaron los valores de líquido ruminal fresco y de los inóculos reactivados por pre-incubación durante 24 h



Alfalfa:  $V_m=357.90$  mL/g,  $L=5.22$  h,  $S=0.030$  h<sup>-1</sup>; Ovillo:  $V_m=333.50$  mL/g,  $L=11.77$  h,  $S=0.029$  h<sup>-1</sup>; cocuite:  $V_m=291.50$  mL/g,  $L=3.83$  h,  $S=0.030$  h<sup>-1</sup>; Guinea:  $V_m=291.20$  mL/g,  $L=12.20$  h,  $S=0.025$  h<sup>-1</sup>.

Específicamente, la cinética de fermentación, la DIVMS 24 y la DIVMS 72 se vieron afectadas por el sustrato de tratamiento y fermentación (Cuadro 3). Independientemente

de la composición de nutrientes del medio utilizado para reactivar el inóculo, hubo una disminución de  $V_m$  ( $P < 0.01$ ) cuando se usó inóculo reactivado en comparación con el líquido ruminal fresco, siendo esta diferencia mayor durante las primeras 24 h (Figura 1). Sin embargo, el tratamiento ALTO24 mostró una mayor  $V_m$  ( $P < 0.01$ ) en comparación con los tratamientos MODE24 o BAJO24 independientemente del sustrato de fermentación. Además, tanto la alfalfa como el pasto de ovinillo tuvieron los  $V_m$  más altos ( $P < 0.01$ ) en todos los tratamientos, con un promedio de  $345.7 \pm 14.40$  mL/g. La interacción del tratamiento  $\times$  sustrato de fermentación fue significativa ( $P < 0.01$ ) para  $L$  y  $S$ . Específicamente,  $L$  fue más alta ( $P < 0.01$ ) para el tratamiento BAJO24 cuando se usó pasto de ovinillo o pasto de Guinea como sustrato de fermentación con una estimación de 22.29 h. Sin embargo, no hubo diferencia en la  $L$  entre los tratamientos cuando se utilizó cocuite como sustrato de fermentación. Además,  $S$  fue menor ( $P < 0.01$ ) para el tratamiento BAJO24 independientemente de los sustratos de fermentación, con un promedio de  $0.018$  h<sup>-1</sup>. Sin embargo,  $S$  alcanzó los valores más altos ( $P < 0.01$ ) en la mayoría de los sustratos de fermentación cuando se utilizó el CONTROL como inóculo seguido de ALTO24.

**Cuadro 3:** Parámetros de la cinética de fermentación ( $V_m$ ,  $L$  y  $S$ ) y digestibilidad *in vitro* de la materia seca a las 24 y 72 h ( $DIVMS_{24}$ ,  $DIVMS_{72}$ ) para inóculos reactivados mediante pre-incubación durante 24 h

Inóculo	Substrato	Parámetro de fermentación <sup>A</sup>				$DIVMS_{24}$ (g/kg)	$DIVMS_{72}$ (g/kg)	% gas a 72 h	% $DIVMS$ a 24h/72h
		$V_m$ (mL/g)	$L$ (h)	$S$ (h <sup>-1</sup> )					
TESTIGO	Alfalfa	435.75a	2.80d	0.043a	558.0a	622.0a	100.0	89.7	
	Ovillo	390.25a	4.89d	0.041ba	538.0a	618.0a	100.0	87.1	
	Cocuite	346.25a	2.46d	0.044a	466.0ba	508.0dc	100.0	91.7	
	Guinea	376.35a	6.09dc	0.036cb	398.0c	550.0cb	99.9	72.4	
LOW24	Alfalfa	309.30b	7.31bc	0.019e	432.0cb	590.0b	94.9	73.2	
	Ovillo	303.20b	20.2a	0.017e	314.0d	624.0a	87.1	50.3	
	Cocuite	207.85c	2.89d	0.020e	324.0d	454.0e	97.1	71.4	
	Guinea	244.10c	24.38a	0.016e	180.0f	424.0e	94.0	42.5	
MODE24	Alfalfa	319.45b	5.14dc	0.025d	482.0ba	674.0a	99.1	71.5	
	Ovillo	307.75b	10.32bc	0.018e	402.0c	636.0a	92.0	63.2	
	Cocuite	288.80c	4.91d	0.025d	382.0c	516.0c	99.1	74.0	
	Guinea	236.90c	10.12bc	0.021ed	252.0e	484.0d	96.1	52.1	
HIGH24	Alfalfa	367.15a	5.64dc	0.033cb	524.0a	630.0a	99.9	83.2	
	Ovillo	333.00b	11.68bc	0.039ba	502.0ba	656.0a	99.9	76.5	
	Cocuite	323.25b	5.04dc	0.030dc	404.0c	512.0c	99.8	78.9	
	Guinea	307.75b	9.85bc	0.025d	324.0d	554.0b	98.5	58.5	
Medias inóculo	CONTROL <sup>y</sup>	387.15 <sup>a</sup>	4.06c	0.041a	490.0a	574.5a	100.0	85.3	
	BAJO24 <sup>x</sup>	266.11c	13.70a	0.018d	312.5d	523.0b	90.0	59.8	
	MODE24 <sup>w</sup>	288.22c	7.62b	0.023c	379.5c	577.5a	98.1	65.7	
	ALTO24 <sup>v</sup>	332.83b	8.05b	0.032b	438.5b	588.0a	99.8	74.6	
Medias forraje	Alfalfa	357.90a	5.22b	0.030a	499.0a	629.0a	99.8	79.3	
	Ovillo	333.50a	11.77a	0.029a	439.0b	633.5a	99.3	69.3	
	Cocuite	291.50b	3.83b	0.030a	394.0c	497.5b	99.8	79.2	
	Guinea	291.20b	12.61a	0.025b	288.5d	503.0b	98.1	57.4	
EEM <sup>B</sup>		14.40	1.290	0.0012	10.80	10.50			
P-values	Inoculum	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001			
	Forage	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001			
	Inoculum × forage	0.0766	0.001	0.0002	0.0012	0.0001			

<sup>A</sup> $V_m$ = volumen máximo de gas;  $L$ = fase lag;  $S$ = porcentaje de producción de gas.

EEM= mayor estandar de la media.

<sup>a-f</sup> Medias en columna con distinta literal son diferentes ( $P<0.01$ ).

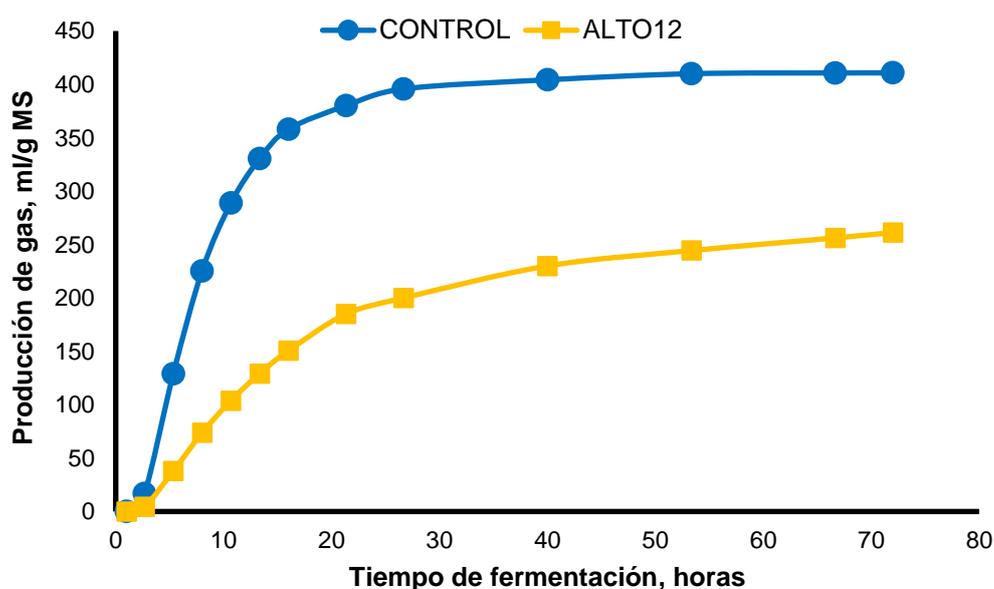
La interacción entre el tratamiento y el sustrato de fermentación fue significativa ( $P<0.01$ ) para la  $DIVMS_{24}$  y la  $DIVMS_{72}$ . Específicamente, cuando se utilizó alfalfa como sustrato de fermentación, la  $DIVMS_{24}$  para los tratamientos MODE24 y ALTO24 fue

similar ( $P \geq 0.1$ ) al CONTROL, con un promedio de  $521.3 \pm 10.8$  g/ kg. Sin embargo, la DIVMS24 para alfalfa fue menor ( $P < 0.01$ ) para el tratamiento BAJO24 en comparación con el CONTROL con estimaciones de 432.0 y  $558.0 \pm 10.8$  g/kg para el tratamiento BAJO y el CONTROL, respectivamente. Igualmente, las DIVMS 72 para los tratamientos MODE24 y ALTO24 fueron similares ( $P \geq 0.1$ ) al CONTROL, con un promedio de  $642.0 \pm 10.5$  g/ kg. Sin embargo, la DIVMS72 para alfalfa fue menor ( $P < 0.01$ ) para el tratamiento BAJO24 en comparación con el CONTROL 24, con estimaciones de 590 y  $622.0 \pm 10.5$  g/kg para el tratamiento BAJO24 y el CONTROL, respectivamente. Se observó la DIVMS72 más baja ( $P < 0.01$ ) para el tratamiento BAJO24 cuando se usó cocuite como sustrato de fermentación con un promedio de  $439.0 \pm 10.5$  g/kg. En general, independientemente del sustrato de fermentación, hubo una depresión ( $P < 0.01$ ) en la DIVMS para el tratamiento BAJO24 en comparación con cualquiera de los otros tratamientos.

### Cinética de fermentación y DIVMS para el inóculo reactivado por 12 h en preincubación

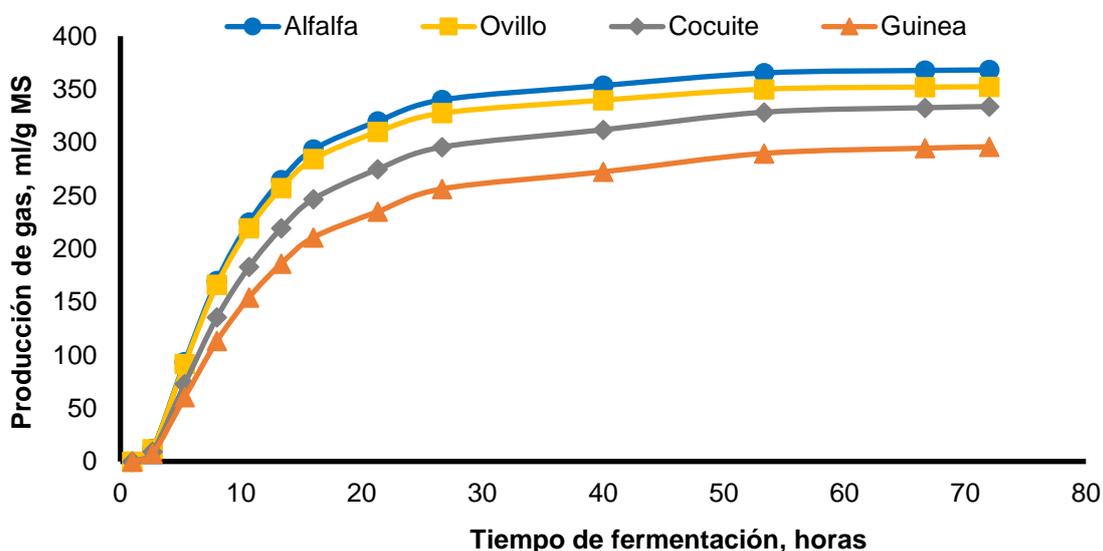
La Figura 3 ilustra la producción de gas *in vitro* para el CONTROL y el inóculo reactivado por incubación durante 12 h. El CONTROL mostró una producción de gas máxima más rápida y mayor en comparación con el tratamiento ALTO12. La Figura 4 ilustra la producción de gas para cada sustrato de fermentación. La alfalfa mostró la producción máxima y más rápida de gas en comparación con el resto de los forrajes, con cocuite y el pasto de Guinea, que tienen los valores más bajos.

**Figura 3.** Producción de gas *in vitro* del testigo y del inóculo preservado y reactivado por pre-incubación durante 12 h en un medio de cultivo



CONTROL, líquido ruminal fresco; ALTO12, inóculo reactivado por pre-incubación durante 12 h en una solución de cultivo basal, extracto de levadura, peptona de caseína y carbohidratos. Testigo:  $V_m=410.80$  mL/g,  $L=5.42$  h,  $S=0.032$  h<sup>-1</sup>; ALTO12:  $V_m=264.97$  mL/g,  $L=4.29$  h,  $S=0.017$  h<sup>-1</sup>.

**Figura 4.** Producción de gas *in vitro* de cuatro forrajes cuando se promediaron los valores de líquido ruminal fresco e inóculo reactivado por pre-incubación durante 12 h



Alfalfa:  $V_m=368.30$  mL/g,  $L=2.13$  h,  $S=0.032$  h<sup>-1</sup>; pasto de ovillo:  $V_m=352.51$  mL/g,  $L=9.19$  h,  $S=0.033$  h<sup>-1</sup>; cocuite:  $V_m=334.16$  mL/g,  $L=3.79$  h,  $S=0.027$  h<sup>-1</sup>; pasto de Guinea:  $V_m=296.56$  mL/g,  $L=4.31$  h,  $S=0.025$  h<sup>-1</sup>.

Específicamente, la cinética de fermentación, la DIVMS 24 y la DIVMS 72 se vieron afectadas por el sustrato de tratamiento y fermentación (Cuadro 4). El  $V_m$  fue mayor ( $P<0.01$ ) para el CONTROL en comparación con el tratamiento ALTO12, con estimaciones de 410.80 y 264.97 ± 13.050 mL / g, respectivamente. La interacción del tipo de inóculo × sustrato de fermentación fue significativa para  $L$  ( $P<0.011$ ); el pasto de ovillo y la alfalfa incubados en el tratamiento ALTO12 tuvieron la mayor y menor ( $P<0.01$ )  $L$ , respectivamente, con estimaciones de 12.4 y 0.07 ± 0.700 h<sup>-1</sup> para pasto de ovillo y alfalfa. Asimismo, se detectó una interacción ( $P<0.01$ ) para  $S$ ; la alfalfa incubada en el CONTROL y el cocuite incubado en el tratamiento ALTO12 tuvieron la mayor y menor  $S$ , respectivamente; con estimaciones de 0.047 y 0.013 ± 0.007 h<sup>-1</sup> para alfalfa y cocuite. Independientemente del tipo de forraje, la DIVMS 24 fue mayor para el CONTROL en comparación con el tratamiento ALTO12, con estimaciones de 520.6 y 374.3 ± 12.70 g/kg, respectivamente. Hubo una interacción de tipo de inóculo x sustrato de fermentación ( $P<0.01$ ) para la DIVMS72, alfalfa y pasto de ovillo incubados en el CONTROL tuvieron la mayor DIVMS72, y cocuite y el pasto de Guinea tuvieron los valores más bajos de DIVMS72.

**Cuadro 4:** Parámetros de fermentación, cinética ( $V_m$ ,  $L$  and  $S$ ) y digestibilidad *in vitro* de la materia seca a 24 y 72 h (DIVMS<sub>24</sub>, DIVMS<sub>72</sub>) para inóculos reactivados 12 h pre-incubación

Inóculo	Substrato	Parámetros de fermentación <sup>A</sup>				DIVMS <sub>24</sub> (g/kg)	DIVMS <sub>72</sub> (g/kg)	% gas a 72 h	% DIVMS a 24 h
		$V_m$ (mL/g)	$L$ (h)	$S$ (h <sup>-1</sup> )					
Testigo	Alfalfa	457.33d	4.19b	0.047f	625.3a	673.3d	100.0	92.9	
	Ovillo	409.96c	6.14b	0.042e	594.6a	678.6d	100.0	87.6	
	Cocuite	400.80c	4.36b	0.041e	463.9b	573.3b	100.0	80.9	
	Guinea	375.10b	7.00b	0.034d	398.6c	551.9b	99.9	72.2	
ALTO12	Alfalfa	279.26a	0.07a	0.017b	461.3b	619.9c	94.7	74.4	
	Ovillo	295.06a	12.24c	0.024c	407.9b	657.3d	97.7	62.1	
	Cocuite	267.53a	3.23ab	0.013a	350.6c	478.6a	82.9	73.3	
	Guinea	218.03a	1.63ab	0.015ab	278.6d	459.9a	90.2	60.6	
Medias de inóculo	Testigo	410.80b	5.42	0.041b	520.6a	619.3b	100.0	84.1	
	ALTO12	264.97a	4.29	0.017a	374.3b	553.9a	93.1	67.6	
Medias de forraje	Alfalfa	368.30b	2.13a	0.032	543.3a	646.6b	99.9	84.0	
	Ovillo	352.51b	9.19c	0.033c	501.3a	667.9b	99.8	75.1	
	Cocuite	334.16b	3.79ab	0.027b	407.3b	525.9a	99.5	77.4	
	Guinea	296.56a	4.31b	0.025a	338.6c	505.9a	99.2	66.9	
EEM <sup>B</sup>		13.050	0.700	0.0007	12.70	7.80			
P-values	Inóculo	0.0001	0.0359	0.0001	0.0001	0.0001			
	Forraje	0.0003	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001			
	Inóculo × forraje	0.1200	0.0001	0.0001	0.0295	0.0006			

<sup>A</sup> Modelo para producción de gas, Schofield *et al.* (1994): Volumen de gas =  $\frac{V_m}{1 + \exp(2 - 4 \times S \times (t - L))}$

Donde  $V_m$  = valor máximo de gas;  $L$  = fase lag,  $S$  = tasa de producción de gas.

<sup>B</sup>EEM = mayor estándar de la media reportado.

a-f: Medias en columna con distinta literal son diferentes ( $P < 0.01$ ).

## Discusión

### Muestreo de líquido ruminal y el uso de glicerol como crioprotector

Los estudios<sup>(31,32,33)</sup> han encontrado diferencias en los patrones de fermentación *in vitro* entre el fluido ruminal de diferentes donantes. La fuente de líquido ruminal puede influir en los ensayos de fermentación y digestibilidad *in vitro*<sup>(31,39)</sup>. Las diferencias en los patrones de fermentación entre los animales observados por esos investigadores pueden atribuirse parcialmente a las diferencias en la composición de la comunidad bacteriana establecida entre los animales huéspedes<sup>(40,41)</sup>. Por lo tanto, en el presente estudio, las muestras de líquido ruminal de tres donantes se agruparon para obtener una muestra representativa para evitar el sesgo debido a la fuente de líquido ruminal.

El uso de glicerol mejora la preservación de la comunidad bacteriana ruminal<sup>(12,13,14)</sup>. Los beneficios del glicerol pueden explicarse por la vitrificación periférica que brinda

protección a las membranas citoplásmicas bacterianas del daño potencial que puede causar la formación de cristales de hielo<sup>(42)</sup>. Específicamente, el glicerol penetra en las células, lo que puede protegerlas de los daños al mantener un estado semifluido<sup>(43,44)</sup>. En consecuencia, el uso de glicerol no solo protege la integridad y la viabilidad de las células bacterianas ruminales, sino que también puede prevenir la degradación del ADN microbiano<sup>(13)</sup>.

La cinética de la fermentación *in vitro* y la DIVMS revelaron diferencias entre el líquido ruminal fresco y el liofilizado. Cuando se comparó con el líquido ruminal fresco, se observó la mayor depresión en los parámetros cinéticos de fermentación cuando los inóculos liofilizados se reactivaron en medios sin azúcares ni promotores del crecimiento. Estas observaciones concuerdan con otros estudios<sup>(15)</sup>, que indican una depresión en los parámetros de fermentación con inóculos congelados, lo que puede explicarse por una disminución en la actividad microbiana debido a la muerte microbiana o la limitación de nutrientes<sup>(9)</sup>. Además, los investigadores han informado<sup>(8)</sup> que las tasas de degradación de proteínas con microorganismos ruminales preservados fueron de 4 a 8 veces más lentas que cuando se usa líquido ruminal fresco. Además, el uso de inóculo conservado por congelación afecta los parámetros de fermentación durante las primeras horas de fermentación<sup>(30)</sup>, y la ultracongelación puede representar un método de conservación mejor en comparación con la congelación a  $-20^{\circ}\text{C}$ . En consecuencia, de acuerdo con informes recientes, la reactivación de bacterias conservadas es uno de los pasos más críticos para obtener microorganismos activos y efectivos para los ensayos de fermentación *in vitro*<sup>(21,22,23)</sup>.

En este estudio, en comparación con el líquido ruminal fresco, los efectos negativos de la liofilización sobre la cinética de la fermentación y la DIVMS fueron menos graves cuando los inóculos ruminales se reactivaron en un medio rico en nutrientes que incluye una solución de cultivo basal, promotores del crecimiento y azúcares. Estas observaciones indican que los promotores del crecimiento como el extracto de levadura y la peptona de la caseína y los carbohidratos como la glucosa, la celobiosa y el almidón aumentan la reactivación de los microorganismos ruminales, mejorando así la fermentación *in vitro*. La necesidad de extracto de levadura en el medio para una reactivación bacteriana adecuada y el crecimiento puede atribuirse a la ausencia de los genes para la síntesis de algunos aminoácidos proteínogénicos como la arginina y la asparagina en el genoma de algunas especies de bacterias ruminales<sup>(45,46)</sup>, lo que indica que estos aminoácidos contenidos en el extracto de levadura deben incluirse en el medio. Además, la peptona de la caseína y los carbohidratos proporcionan una reactivación, crecimiento y actividad microbiana adecuada y estimulada por la energía y el nitrógeno fácilmente disponibles<sup>(19,47)</sup>. Es interesante observar los diferentes patrones (producción de gas en diferentes puntos de tiempo) entre las curvas de fermentación, lo que sugiere que diferentes poblaciones microbianas pueden actuar sobre los sustratos en cada punto de tiempo de fermentación. Investigación futura en el tema debe tener como objetivo evaluar los cambios en la estructura de la comunidad microbiana<sup>(48,49)</sup> utilizando técnicas como

la secuenciación de ADN de alto rendimiento<sup>(50,51,52)</sup>, que permite una evaluación amplia del perfil de la comunidad microbiana de los niveles taxonómicos de mayor a menor.

Se ha encontrado que, en comparación con el fluido ruminal fresco, la digestibilidad de la alfalfa disminuyó 17.63% cuando se usó inóculo congelado o inóculo liofilizado reactivado por 24 h de preincubación en la solución de McDougall<sup>(9)</sup>. En contraste con observaciones anteriores<sup>(9)</sup>, en el presente estudio, la DIVMS 72 no se vio afectada cuando se usó inóculo liofilizado reactivado por 24 h de preincubación en un medio rico en nutrientes; lo que indica que, en comparación con el uso de la solución de McDougall, usar un medio rico en nutrientes que contenga una gama más amplia de nutrientes constituye un mejor enfoque para estimular la reactivación y la actividad de los microorganismos ruminales.

Cuando se promedió a través de sustratos de fermentación (es decir, alfalfa, pasto ovillo, cocuite y pasto de Guinea), la DIVMS para cualquiera de los inóculos reactivados resultó afectada negativamente, en comparación con los valores obtenidos con el control. Sin embargo, dentro de los inóculos liofilizados, la reactivación mediante preincubación de 24 h en un medio rico en nutrientes mostró el mejor rendimiento. Además, cuando el inóculo se reactivó 12 h antes de la incubación, los valores de DIVMS fueron más bajos en comparación con el líquido ruminal fresco del control. Es importante tener en cuenta que, a las 72 h de fermentación, todos los forrajes, excepto el cocuite, alcanzaron casi 100% del gas total producido. Esto indica que las tasas de fermentación de 72 h no son adecuadas para medir la efectividad de los tratamientos, lo que también sugiere que un mejor enfoque sería medir las tasas de fermentación y el DIVMS a las 24 o 48 h de fermentación.

### **Efecto del sustrato de fermentación sobre la cinética de fermentación y DIVMS**

El uso de sustratos de fermentación con una amplia gama de composición de nutrientes facilitó la evaluación de nuestra hipótesis en diferentes escenarios. En general, los resultados revelaron que los forrajes de zonas templadas, a saber, alfalfa y pasto de ovillo, tenían un mayor  $V_m$  y una mayor DIVMS en comparación con sus contrapartes de las regiones tropicales. Estas observaciones probablemente se debieron a las diferencias en los componentes estructurales de la pared celular de la planta que existen entre los forrajes de zonas templadas y los de las zonas tropicales<sup>(53)</sup>.

Por otro lado, se han sugerido fuentes de inóculo alternativas para las fermentaciones *in vitro*. Una de estas fuentes son las heces de rumiantes; sin embargo, los resultados han sido inconsistentes. Por ejemplo, se ha demostrado que el inóculo fecal es eficaz para los estudios de producción de gas *in vitro*<sup>(54)</sup>; sin embargo, el inóculo fecal de ovejas no fue comparable con el líquido ruminal fresco cuando se evaluó la digestibilidad de la materia seca *in vitro*<sup>(55)</sup>. Además, otros estudios han revelado que el inóculo fecal no funciona tan bien como el líquido ruminal en las técnicas de fermentación *in vitro*<sup>(55,56)</sup>, lo que puede

deberse a diferencias en las poblaciones bacterianas entre el rumen y el tracto gastrointestinal inferior<sup>(57)</sup>.

## Conclusiones e implicaciones

La cinética de la fermentación *in vitro* y la DIVMS se vieron afectadas por la liofilización del líquido ruminal. En la mayoría de los casos, los parámetros de fermentación *V<sub>m</sub>*, *L* y *S* se afectaron negativamente cuando se utilizó el inóculo ruminal liofilizado. Sin embargo, cuando se añadió glicerol al inóculo ruminal liofilizado y se reactivó durante 24 h en un medio rico en nutrientes previo a la incubación, incluidos los promotores del crecimiento y los azúcares, los efectos negativos de la liofilización en la cinética de la fermentación *in vitro* y la DIVMS fueron menos graves. Como se esperaba, la alfalfa y el pasto de ovido tuvieron un mayor *V<sub>m</sub>* y una mayor DIVMS en comparación con el cocuite y el pasto de Guinea. Los resultados presentados en este estudio proporcionan nuevos conocimientos sobre la reactivación del inóculo ruminal preservado, así como su utilización en ensayos de fermentación y digestión *in vitro* para laboratorios con acceso limitado a animales fistulados o líquido ruminal fresco. Investigaciones futuras deberían explorar los cambios en las poblaciones microbianas del rumen durante las fermentaciones *in vitro* utilizando la secuenciación de ADN de alto rendimiento para comprender cómo los cambios en los perfiles microbianos conducen a los diferentes patrones observados entre las curvas de fermentación.

## Literatura citada:

1. Narvaez N, Wang Y, Xu Z, McAllister T. Effects of hops on *in vitro* ruminal fermentation of diets varying in forage content. *Livest Sci* 2011;138:193–201.
2. Anele UY, Refat B, Swift ML, Zhao YL, Doublier C, McAllister TA, *et al.* *In vitro* ruminal fermentation of ground and dry-rolled barley grain differing in starch content. *Anim Feed Sci Technol* 2015;203:88–94.
3. Pal K, Patra AK, Sahoo A, Kumawat PK. Evaluation of several tropical tree leaves for methane production potential, degradability and rumen fermentation *in vitro*. *Livest Sci* 2015;180:98–105.
4. Bochi-Brum O, Carro MD, Valdés C, González JS, López S. *In vitro* digestibility of forages and concentrates: effect of diet on donor animals. *Arch Zoot* 1999;48:51–61.
5. Bueno ICS, Cabral LS, Gobbo SP, Louvandini H, Vitti DM, Abdalla L. Influence of inoculum source in a gas production method. *Anim Feed Sci Technol* 2005;124:95–105.
6. Mould FL, Kliem KE, Morgan R, Mauricio RM. *In vitro* microbial inoculum: A review of its function and properties. *Anim Feed Sci Technol* 2005;123:31–50.

7. Luchini ND, Broderick GA, Combs DK. In vitro determination of ruminal protein degradation using freeze-stored ruminal microorganisms. *J Anim Sci* 1996;74:2488–2499.
8. Luchini ND, Broderick GA, Combs DK. Preservation of ruminal microorganisms for in vitro determination of ruminal protein. *J Anim Sci* 1996;74:1134–1143.
9. Meneses M, Madrid SJ, Hernández RF, Megias MD. Evaluación de diferentes métodos de conservación del líquido ruminal para pruebas *in vitro*. *Sociedad Española de Ovinotecnia y Caprinotecnia* 2000;25:315-317.
10. Malik KA. Cryopreservation of bacteria with special reference to anaerobes. *World J Microbiol Biotechnol* 1991;7:629-632.
11. Perry SF. Freeze-drying and cryopreservation of bacteria. *Mol Biotechnol* 1998;9:59-64.
12. Rojas-Tapias D, Ortiz-Vera M, Rivera D, Kloepper J, Bonilla R. Evaluation of three methods for preservation of *Azotobacter chroococcum* and *Azotobacter vinelandii*. *Universitas Scientiarum* 2013;18(2):129-139.
13. McKain N, Genc B, Snelling TJ, Wallace RJ. Differential recovery of bacterial and archaeal 16S rRNA genes from ruminal digesta in response to glycerol as cryoprotectant. *J Microbiol Methods* 2013;95:381–383.
14. Fliegerova K, Tapio I, Bonin A, Mrazek J, Callegari ML, Bani P, *et al*. Effect of DNA extraction and sample preservation method on rumen bacterial population. *Anaerobe* 2014;29:80–84.
15. Hervas G, Frutos P, Giráldez FJ, Mora MJ, Fernández B, Mantecón AR. Effect of preservation on fermentative activity of ruminal fluid inoculum for *in vitro* gas production techniques. *Anim Feed Sci Technol* 2005;124:107-118.
16. NRC. Nutrient requirements of beef cattle. 7th rev. ed. Washington, DC; Natl Acad Press; 2000.
17. Beaudet V, Gervais R, Graulet B, Nozière P, Doreau AM, Fanchone A, *et al*. Effects of dietary nitrogen levels and carbohydrate sources on apparent ruminal synthesis of some B vitamins in dairy cows. *J Dairy Sci* 2016;99:2730–2739.
18. Stern MD, Hoover WH. Methods for determining and factors affecting rumen microbial protein synthesis: a review. *J Anim Sci* 1979;49:1590–1603.
19. Russell JB. Rumen Microbiology and its role in ruminant nutrition. Russell JB editor. Ithaca, NY, USA: Publ. Co; 2002.
20. Fernando SC, Purvis II HT, Najar FZ, Sukharnikov L, Nagaraja TG, Krehbiel CR, *et al*. Rumen microbial population dynamics during adaptation to high-grain diet. *Appl Environ Microbiol* 2010;76:7482–7490.

21. Muller JA, Stanton C, Sybesma W, Fitzgerald GF, Ross RP. Reconstitution conditions for dried probiotic powders represent a critical step in determining cell viability. *J Appl Microbiol* 2012;108:1369–1379
22. Hoefman S, Van Hoorde K, Boon N, Vandamme P, De Vos P, Heylen K. Survival or revival: long-term preservation induces a reversible viable but non-culturable state in methane-oxidizing bacteria. *PLoS ONE* 2012;7(4):e34196.
23. Miyamoto-Shinohara Y, Sukenobe J, Imaizumi T, Nakahara T. Survival of freeze-dried bacteria. *J Gen Appl Microbiol* 2008;54:9–24.
24. Association of Official Analytical Chemists. ‘Official Methods of Analysis.’ 17th ed. (AOAC). Arlington, VA, USA. 2000.
25. Goering HK, Van Soest PJ. Forage fiber analysis (apparatus, reagents, procedures and some applications). *Agr Res Serv, USDA, Washington, DC, USA, Agriculture Handbook No 379*; 1970.
26. Witham FH, Blaydes DF, Devlin RM. *Experiments in plant physiology*. Van Nostrand New York, USA: Reinhold Company; 1971.
27. Udén P, Robinson PH, Mateos GG, Blank R. Use of replicates in statistical analyses in papers submitted for publication in *Animal Feed Science and Technology*. *Anim Feed Sci Technol* 2012;171:11–15.
28. Castro-Montoya J, De Campeneere S, Van Ranst G, Fievez V. Interactions between methane mitigation additives and basal substrates on *in vitro* methane and VFA production. *Anim Feed Sci Technol* 2012;176:47–60.
29. Ferraro SM, Mendoza GD, Miranda LA, Gutiérrez CG. *In vitro* ruminal fermentation of glycerol, propylene glycol and molasses combined with forages and their effect on glucose and insulin blood plasma concentrations after an oral drench in sheep. *Anim Feed Sci Technol* 2016;213:74–80.
30. Prate A, de Oliveira JA, Abecia L, Fondevila M. Effects of preservation procedures of rumen inoculum on *in vitro* microbial diversity and fermentation. *Anim Feed Sci Technol* 2010;150:186–193.
31. Johnson RR. Techniques and procedures for *in vitro* and *in vivo* rumen studies. *J Anim Sci* 1966;25:855–875.
32. Nelson BD, Ellzey HD, Montgomery C, Morgan EB. Factors affecting the variability of an *in vitro* rumen fermentation technique for estimating forage quality. *J Dairy Sci* 1972;55:358–366.
33. Pehrson A, Faber WE. Individual variation of *in vitro* dry matter digestibility in moose. *J Range Manage* 1994;47:392–394.

34. Jones GA, Pickard MD. Effect of titanium citrate as reducing agent on growth of rumen bacteria. *Appl Environ Microbiol* 1980;39:144-1147.
35. Theodorou MK, Williams BA, Dhanoa MS, McAllan AB, France J. A simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feeds. *Anim Feed Sci Technol* 1994;48:185–197.
36. Antúnez G, Cajarville C, Britos A, González A, Repetto JL. Ruminant inoculum activity in cattle supplemented with corn grain at different daily frequencies: evaluation using the *in vitro* gas-production technique. *Anim Prod Sci* 2014;54:1662–1664.
37. Schofield P, Pitt RE, Pell AN. Kinetics of fiber digestion from *in vitro* gas production. *J Anim Sci* 1994;72:2980–2991.
38. SAS. SAS/STAT User's guide (Release 9.1). SAS Institute Inc., Cary, NC, USA, 2004.
39. Williams BA. Cumulative gas-production techniques for forage evaluation. In: Forage evaluation in ruminant nutrition. Givens DI, *et al.* editors. Wallingford. UK: CAB International; 2000.
40. Weimer PJ, Stevenson DM, Mantovani HC, Man SLC. Host specificity of the ruminal bacterial community in the dairy cow following near-total exchange of ruminal contents. *J Dairy Sci* 2010;93:5902–5912.
41. Weimer PJ, Stevenson DM, Mertens DR. Shifts in bacterial community composition in the rumen of lactating dairy cows under milk fat-depressing conditions. *J Dairy Sci* 2010;93:265–278.
42. Kim SJ, Yim JH. Cryoprotective properties of exopolysaccharide (P-21653) produced by the Antarctic bacterium, *Pseudoalteromonas artica* KOPRI 21653. *J Microbiol* 2007;46:510–514.
43. Hubálek Z. Protectant used in the cryopreservation of microorganisms. *Cryobiology* 2003;46:205–229.
44. Hancocks NH, Thomas CR, Stocks SM, Hewitt CJ. An investigation into the preservation of microbial cell banks for  $\alpha$ -amilase production during 5 l fed-batch *Bacillus licheniformis* fermentations. *Biotechnol Lett* 2010;32:1405–1412.
45. Geissinger O, Herlemann DPR, Morschel E, Maier UG, Brune A. The ultramicrobacterium “*Elusimicrobium minutum*” gen. nov., sp. nov., the first cultivated representative of the termite group I phylum. *Appl Environ Microbiol* 2009;75:2831–2840.
46. Herlemann DPR, Geissinger O, Ikeda-Ohtsubo W, Kunin V, Sun H, Lapidus A, *et al.* Genomic analysis of “*Elusimicrobium minutum*,” the first cultivated

- representative of the phylum “*Elusimicrobia*” (formerly termite group 1). *Appl Environ Microbiol* 2009;75:2841–2849.
47. McAllister TA, Bae HD, Jones GA, Cheng KJ. Microbial attachment and feed digestion in the rumen. *J Anim Sci* 1994;72:3004–3018.
  48. Castillo-Lopez E, Moats J, Aluthge ND, Ramirez Ramirez HA, Christensen D, Mutsvangwa T *et al.* Effect of partially replacing a barley-based concentrate with flaxseed-based products on the rumen bacterial population of lactating Holstein dairy cows. *J Appl Microbiol* 2017;124:42-57.
  49. Castillo-Lopez E, Jenkins CJR, Aluthge ND, Westom T, Fernando SC, Kononoff PJ. The effects of regular or low-fat distillers grains and solubles on rumen methanogenesis and the rumen bacterial community. *J Appl Microbiol* 2017;123:1381-1395.
  50. Danielsson R, Dicksved J, Sun L, Gonda H, Muller B, Schnurer A, Bertilsson J. Methane production in dairy cows correlates with rumen methanogenic and bacterial community structure. *Front Microbiol* 2017;8:226.
  51. Anderson CL, Schneider CJ, Erickson GE, MacDonald JC, Fernando SC. Rumen bacterial communities can be acclimated faster to high concentrate diets than currently implemented feedlot programs. *J Appl Microbiol* 2016;120:588–599.
  52. Castillo-Lopez E, Klopfenstein TJ, Anderson C, Aluthge ND, Fernando SC, Kononoff PJ. Effect of feeding dried distillers grains with solubles on rumen biohydrogenation, intestinal fatty acid profile and gut microbial diversity evaluated through DNA pyro-sequencing. *J Anim Sci* 2014;92:733–743.
  53. Saydack AH, Grant CC, Smit IP, Vermeulen WJ, Baard J, Zambatis N. Climate and vegetation in a semi-arid savanna: Development of a climate-vegetation response model linking plant metabolic performance to climate and the effects on forage availability for large herbivores. *Koedoe* 2012;54:1–12.
  54. Posada SL, Noguera RR, Segura JA. Ruminant feces used as inoculum for the *in vitro* gas production technique. *Rev Colomb Cienc Pecu* 2012;25:592-600.
  55. Hughes M, Mlambo V, Lallo CHO, Jennins PGA. Potency of microbial inocula from bovine faeces and rumen fluid for *in vitro* digestion of different tropical forage substrates. *Grass Forage Sci* 2012;67:263-273.
  56. Zicarelli F, Calabro S, Cutrignelli MI, Infascelli F, Tudisco R, Bovera F *et al.* *In vitro* fermentation characteristics of diets with different forage/concentrate ratios: comparison of rumen and faecal inocula. *J Sci Food Agric* 2011;91:1213-1221.
  57. Castillo-Lopez E, Klopfenstein TJ, Fernando SC, Kononoff PJ. *In vivo* determination of rumen undegradable protein of dried distillers grains with solubles and evaluation of duodenal microbial crude protein flow. *J Anim Sci* 2013;91:924-934.