

MODULACIÓN DE LA FERMENTACIÓN RUMINAL: DESAFÍOS Y OPORTUNIDADES

David R. Yáñez-Ruiz

Estación Experimental el Zaidín (CSIC), Profesor Albareda, 1, 18008, Granada
david.yanez@eez.csic.es

1.- INTRODUCCIÓN

Los rumiantes son animales peculiares en su anatomía y fisiología digestivas. La presencia de una cámara de fermentación pre-gástrica, el rumen, que alberga una compleja población microbiana (bacterias, protozoos, hongos, arqueas y virus), les permite utilizar recursos fibrosos vegetales que de otra forma no lo serían por las enzimas digestivas del animal. La fermentación microbiana de los alimentos en el rumen origina ácidos grasos volátiles (AGV) y proteína microbiana, que son utilizados por el animal. Esto les confiere a los rumiantes la capacidad de alimentarse a base de recursos alimenticios (pastos, forrajes y arbustos) que no son utilizables por otras especies y poder hacer uso de recursos fibrosos como subproductos derivados de la industria alimentaria (oleícola, vitivinícola, hortalizas, cítricos...), que en el caso de España representa un volumen anual muy significativo (MAGRAMA, Anuario de estadística agroalimentaria, 2012). Por otro lado, como resultado de la fermentación microbiana de los alimentos en el rumen se originan proteína calor y gases, principalmente CO₂, CH₄, H₂.

La relación simbiótica que se establece entre el ecosistema microbiano y el rumiante adulto es muy específica, lo que determina que la población microbiana varíe de un individuo a otro (Jami y Mizrahi, 2012). Los intentos realizados para modificar la composición de la microbiota del rumen mediante cambios en la alimentación para

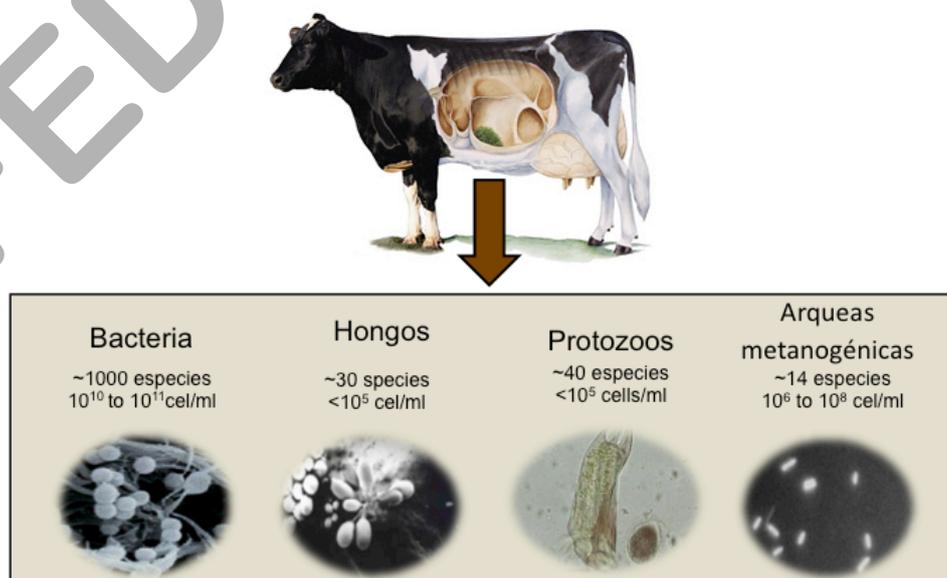
maximizar la eficiencia digestiva se ven en muchas ocasiones impedidos por la resistencia que ofrece el ecosistema ruminal a ser alterado, una vez está totalmente establecido en el animal adulto. Ejemplos de esta dificultad de manipulación son: el intento de reducir la producción de metano en rumiantes mediante el uso de aditivos alimenticios (Martínez-Fernández et al., 2013), maximizar la digestión de forrajes de mala calidad nutritiva o subproductos alimenticios (Molina-Alcaide y Yáñez-Ruiz, 2008), reducir la degradación de la proteína de la dieta en el rumen (Bach et al., 2005) o maximizar la capacidad tamponadora de pH del rumen cuando el animal se alimenta con un nivel muy bajo de fibra larga y alto contenido de carbohidratos fácilmente fermentables (Mohamed et al., 2012).

En este trabajo se presentan algunas de las estrategias que actualmente se están investigando para modular la microbiota y fermentación ruminal y los desafíos más importantes para ponerlas en práctica. Durante las jornadas se presentarán las estrategias más relevantes con más detalle.

2.- MICROBIOTA RUMINAL

La microbiota ruminal constituye una comunidad microbiana diversa, y altamente específica en relación a sus funciones metabólicas, que son esenciales para el desarrollo, salud y nutrición del rumiante (Morgavi et al., 2010). Los principales microorganismos del rumen se clasifican en bacterias, protozoos, arqueas metanogénicas, hongos y virus (Figura 1). Se estima que en el ecosistema ruminal existen más de 1.000 especies distintas (Deng et al., 2008), pertenecientes filogenéticamente a los dominios Bacteria, Archaea y Eucarya. La mayor parte de estos microorganismos no han sido aún cultivados pero la aplicación de técnicas moleculares ha permitido estimar que, por ejemplo, las bacterias ruminales representan más de 400 filotipos (Edwards et al., 2004; Yu et al., 2006).

Figura 1.- Principales grupos microbianos del rumen



La microbiota ruminal es dinámica y puede verse afectada por diversos factores, tales como la dieta, la especie o la edad del animal, la presencia de aditivos en la dieta, la zona geográfica en la que se asienta una determinada explotación ganadera o la estación del año (Zhou et al., 2010). Los microorganismos ruminales establecen entre sí relaciones complejas de cooperación, que permiten la degradación del alimento que llega al rumen y, en consecuencia, la utilización de sus nutrientes. También se establecen relaciones de competencia, intra e inter-específica, y de predación (Ley et al., 2006).

La mayoría de los microorganismos presentes en el rumen son anaerobios estrictos aunque existen anaerobios facultativos, que metabolizan el oxígeno que llega al rumen a través del alimento, del agua de bebida o de las paredes del rumen. La anaerobiosis se mantiene en el rumen gracias a los gases generados durante la fermentación, dióxido de carbono, metano e hidrógeno. Solo los microorganismos capaces de tolerar un potencial redox bajo (-350 mV) pueden sobrevivir en el rumen (Kamra, 2005). La temperatura óptima en este órgano es de 39°C. Además, los microorganismos ruminales disponen de moléculas que permiten la adhesión, colonización y degradación de los sustratos, capaces de inhibir el crecimiento de competidores (bacteriocinas) o de resistir al sistema inmunitario del animal hospedador. Esta plasticidad genética les permite adaptarse a los cambios en dicho hábitat, lo que junto a las elevadas tasas de multiplicación permite el mantenimiento de densidades estables de microorganismos; (Ley et al., 2006), lo que favorece la supervivencia y crecimiento en dicho ecosistema en relación al tiempo de residencia del alimento en el rumen.

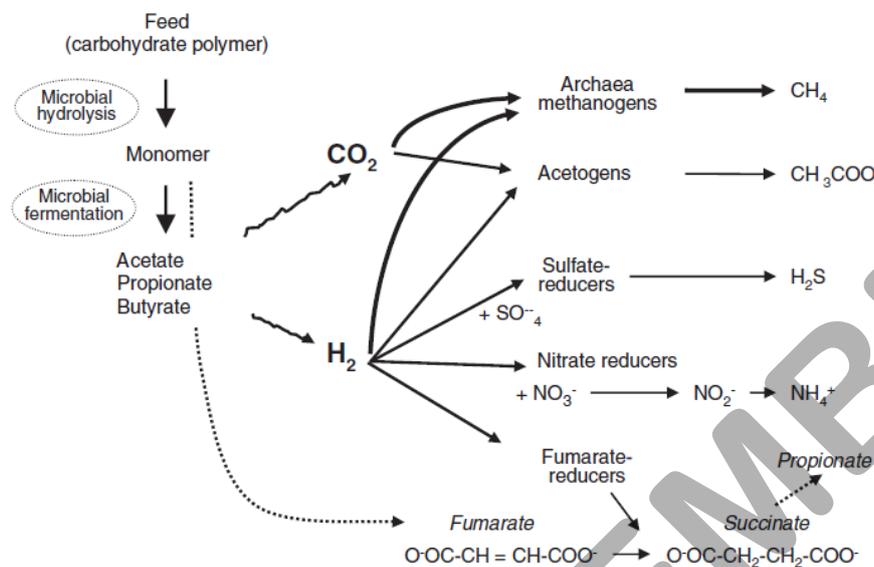
3.- DESAFÍOS

Durante la exposición en las jornadas se presentarán dos cuestiones principalmente: i) la reducción de la producción de metano entérico por parte de los rumiantes y ii) la mejora de la fermentación de carbohidratos y disminución de la incidencia de acidosis metabólica.

i) Reducción de la producción de metano entérico por parte de los rumiantes

La formación de metano representa una pérdida energética importante para el ruminante (2-12% de energía bruta ingerida; Johnson y Johnson, 1995) pero supone la principal vía metabólica para mantener la concentración de H₂ dentro de límites fisiológicos del ecosistema microbiano y así permitir que la cadena de degradación orgánica en el rumen no se detenga (Figura 2). Por otro lado, el metano es un gas que contribuye de manera importante al denominado “efecto invernadero”, con un potencial radiativo más de 20 veces superior al del CO₂. Los rumiantes domésticos producen más de 80 millones de toneladas de CH₄ anuales, lo que supone alrededor del 33% del total de metano antrópico emitido (Beauchemin et al., 2008), habiéndose estimado que en España ese porcentaje es del 31% (MAGRAMA, 2011).

Figura 2. Esquema de la fermentación de los polisacáridos y uso del H₂ resultante en el rumen (Morgavi et al., 2010)



Para el desarrollo de estrategias que permitan reducir las emisiones de metano procedentes de los rumiantes han de considerarse tanto las rutas metabólicas implicadas en la formación y en la utilización del H₂ en el rumen, como la comunidad de arqueas metanogénicas (Martin et al., 2010). Cualquier estrategia, dirigida a reducir la producción de metano en el rumen requeriría, por tanto hacerlo a través de alguna o varias de las siguientes vías (McAllister y Newbold, 2008; Martin et al., 2010):

- La reducción de la cantidad de H₂ producido en el rumen, sin afectar a la digestión de los alimentos.
- El aumento de la utilización del H₂ en rutas metabólicas alternativas, que permitan obtener productos finales de la fermentación beneficiosos para el animal.
- La reducción de la actividad de las arqueas metanogénicas en el rumen.

ii) Mejora de la fermentación de carbohidratos y disminución de la incidencia de acidosis metabólica

Por otro lado, la intensificación en el sistema de manejo del ganado y en particular de la alimentación, ha resultado en muchos casos en sistemas en los que los rumiantes se alimentan fundamentalmente a base de granos y concentrados, ricos en almidón. En el caso de España, con escasez de pastos y producción de forrajes, esta situación se ha acusado significativamente, y una de las consecuencias más frecuentes es la alta incidencia de acidosis metabólica, una patología derivada de la incapacidad del rumen de lidiar con una excesiva producción de ácido láctico (Aschenbach et al., 2011). Así, la importancia de los procesos de fermentación que suceden en el rumen hace que la manipulación de este complejo ecosistema haya sido y continúe siendo un campo de investigación fundamental en nutrición animal para mejorar la eficiencia de la actividad digestiva.

4. MODULADORES DE LA FERMENTACIÓN RUMINAL

En los últimos años y, especialmente tras la prohibición en Europa del uso de los antibióticos en la dieta del ganado (Casewell et al., 2003) como promotores del crecimiento, se ha estimulado la búsqueda de aditivos que modulen la actividad ruminal y puedan emplearse como sustitutos de los antibióticos. Asimismo, ha aumentado globalmente la preocupación por el aumento de las emisiones de gases con efecto invernadero con una contribución especialmente importante de la actividad ganadera.

Así se están llevando a cabo numerosos estudios para evaluar los efectos que tienen distintos compuestos, mayoritariamente extractos de plantas como aceites esenciales, compuestos organosulfurados, etc. o compuestos diseñados y sintetizados para tal efecto sobre la fermentación ruminal y la producción de metano. Los resultados obtenidos son, en ocasiones, contradictorios, difíciles de interpretar y proporcionan poca información sobre los mecanismos de acción de los compuestos estudiados. Ello puede deberse a factores como la gran diversidad y origen de los compuestos empleados, las condiciones de estudio de sus efectos (in vitro vs. in vivo) y la dieta que el animal recibe (Hart et al., 2008; Yáñez-Ruiz et al., 2016), entre otros.

Los compuestos utilizados en los estudios que se presentarán en estas jornadas pertenecen esencialmente a dos categorías: compuestos derivados de plantas y compuestos sintéticos. Entre los derivados de plantas se encuentran: saponinas, taninos, aceites esenciales (puros o combinados) y compuestos organosulfurados. Entre los compuestos de síntesis se puede destacar: ionóforos, halogenados y otros compuestos de producción aún experimental.

5.- LIMITACIONES DE USO DE COMPUESTOS QUE MODULAN LA FERMENTACIÓN RUMINAL

Existen distintas limitaciones al uso de compuestos que modulan la fermentación ruminal como estrategia alimentaria en rumiantes, destacándose los siguientes:

5.1.- Pureza de los compuestos utilizados

Existen evidencias de que dosis similares de los mismos compuestos vegetales, con distinta pureza, provocan efectos diferentes sobre la fermentación ruminal (Hart et al., 2008; Soliva et al., 2011). Superar esta limitación requiere estandarizar la concentración y actividad de los compuestos, así como la composición de las mezclas de dichos compuestos que se utilizan en los diferentes estudios.

5.2.- Adaptación del ecosistema microbiano del rumen a su presencia

Los ecosistemas microbianos, y en particular el del rumen, tienen una gran capacidad para adaptarse o degradar un amplio rango de compuestos naturales o sintéticos (Benchaar y Greathead, 2011). Algunas especies de bacterias ruminales son capaces de crecer en presencia de concentraciones elevadas de aceites esenciales y, por tanto, de adaptarse a los mismos (McIntosh et al. 2003). La diversidad de las arqueas metanogénicas del rumen varía cuando los animales se tratan con compuestos derivados de plantas (Ohene-Adjei et al., 2008). También se ha observado que ciertos compuestos no afectan a la fermentación ruminal en ensayos prolongados, tanto *in vitro* como *in vivo* (Cardozo et al., 2004; Klevenhusen et al., 2011). Esta variabilidad de resultados se podría explicar por una adaptación del ecosistema, en función del tiempo de tratamiento. Wang et al. (2000) observaron que, tras un tiempo relativamente corto de tratamiento, el efecto de las saponinas sobre los protozoos en cultivos *in vitro* desaparecía sugiriéndose una degradación de las mismas por parte de ciertas bacterias.

5.3.- Naturaleza de la dieta suministrada al rumiante y pH ruminal.

La naturaleza de la dieta incubada, en los estudios *in vitro*, o suministrada a los animales, en los estudios *in vivo*, así como el pH que promueve la fermentación de las mismas modula el efecto de los aceites esenciales (Molero et al., 2004; Cardozo et al., 2005). Wallace et al. (2002) sugirieron que el efecto de mezclas de aceites esenciales depende de la degradabilidad de la proteína dietética, siendo tanto más evidente cuanto mayor es la degradabilidad. El tipo (Duval et al., 2007) y la cantidad (Mateos et al., 2013) de carbohidratos de la dieta también modula el efecto de aceites esenciales y de compuestos organosulfurados.

5.4.- Dificultad para extrapolar las condiciones ensayadas y los resultados obtenidos *in vitro* a la situación *in vivo*

Los efectos de ciertos compuestos sobre la fermentación ruminal, observados *in vitro*, desaparecen o disminuyen en ensayos *in vivo*. Esta falta de efecto puede deberse a distintos factores; uno de ellos es la dificultad de extrapolar las dosis utilizadas *in vitro* a condiciones *in vivo* debido, sobre todo, a la complejidad del ecosistema microbiano del rumen. En general, se requieren dosis superiores a las utilizadas *in vitro* para que el efecto de un determinado compuesto se haga patente en el animal. No obstante, se ha de tener precaución ya que las dosis necesarias para detectar efectos *in vivo* pueden ser demasiado elevadas (Beauchemin et al., 2009).

La actividad de los compuestos depende de la probabilidad de que el componente activo interactúe con los microorganismos, lo que es función de la concentración de dicho componente, del tamaño de las poblaciones microbianas y de la complejidad del ecosistema ruminal (Calsamiglia et al., 2007). Otro factor diferencial entre las condiciones

in vitro e in vivo puede ser la homogeneidad con la que el compuesto o compuestos estudiados se distribuyen. Esa homogeneidad es mayor in vitro lo que hace que, en esas condiciones, los microorganismos se expongan más rápidamente a la actividad de los compuestos que en el rumen. También ha de considerarse, como se ha señalado anteriormente, la posible adaptación del ecosistema microbiano a algunos compuestos tras su suministro al animal durante un periodo de tiempo prolongado (Benchaar y Greathead, 2011; Bodas et al., 2012).

El tiempo de permanencia de la digesta en el rumen, que depende de un número importante de factores (relación forraje:concentrado, tamaño de partícula, nivel de ingestión, contenido y digestibilidad de la fibra, etc.), que han de tenerse en cuenta para extrapolar condiciones ensayadas in vitro a estudios in vivo. Los sistemas cerrados implican, por definición, la no renovación del medio de fermentación, y los fermentadores continuos y semi-continuos pueden no simular totalmente los flujos de salida de las fracciones sólida y líquida de la digesta ruminal. Cuando se trata de aplicar una dosis de un determinado compuesto, previamente estudiada en sistemas de cultivo in vitro, a animales alimentados a nivel de mantenimiento debe de tenerse en cuenta el tiempo fraccional de paso de la digesta a través del rumen (Yáñez-Ruiz et al., 2004), siendo posible que el incremento de la dosis haya de ser de hasta el 80% con respecto a la utilizada in vitro. Ello puede explicar el que una misma dosis de aceite de rábano provoque una disminución de la producción de metano in vitro del 90% y cambios en otros parámetros de la fermentación ruminal, mientras que en terneros la disminución sea solo del 19% y no afecte a otros parámetros de la fermentación (Mohammed et al., 2004). Otro aspecto importante es, como señalan Soto et al. (2012; 2013), que la microbiota que se desarrolla en sistemas in vitro es diferente de la que existe en el rumen.

5.5.- Posible transferencia de residuos de los compuestos a los productos animales

Los estudios sobre la presencia de residuos, en leche o carne, de extractos de plantas son limitados aunque existen indicios de la presencia de terpenos, procedentes de forrajes, en la leche de vaca, que alteran sus propiedades organolépticas (Viallonista et al., 2000; Tornambé et al., 2006). Hallier et al. (2013) no han observado residuos en la leche de vaca de timol, carvacrol, cinamaldehído o dialil disulfuro, administrados en dosis de 120 mg/día durante 3 semanas. Trabajos recientes, llevados a cabo en vacuno lechero en el marco del proyecto Europeo FP7-SMEthane (www.smethane.eu), han mostrado, mediante cromatografía de gases-masas, la ausencia, en la leche, de aceites esenciales o sus posibles metabolitos de degradación, tras suministrar una mezcla de estos aceites en la dieta a razón de 1g/animal/día, durante 42 días. Dada la limitada información existente, se requieren estudios más detallados y de larga duración para determinar si existen residuos de aditivos dietéticos en leche o carne.

5.6.- Estabilidad de los aditivos durante su almacenamiento

Un aspecto a considerar y, no menos importante que los señalados anteriormente, es el que se refiere a la estabilidad y conservación de los aditivos a lo largo del tiempo. En el caso de los extractos de plantas, el solvente y su dilución, así como el tiempo, la temperatura, presión, etc., requeridas para la extracción del compuesto objeto de estudio, pueden afectar a la actividad del mismo (Bodas et al., 2012). Así, el cinamaldehído se descompone cuando se calienta a 60°C mientras que si se mezcla con otros compuestos, como el eugenol o el extracto de canela, se mantiene estable durante 30 minutos, con temperaturas de hasta 200°C (Friedman et al., 2000). Por otro lado, las condiciones en las que el aditivo se introduce en la dieta (mezclado con el grano, en harina, en pellets, en el agua, etc.) pueden, tener un enorme impacto sobre la degradación de las moléculas activas de cada mezcla. Así, en el desarrollo del proyecto europeo FP7 SMethane (www.smethane.eu) se ha observado que la peletización puede implicar la pérdida de entre el 26 y el 92 % del compuesto activo y que su almacenamiento puede hacer que se pierda entre el 2 y el 88 % del compuesto activo. Esta variación estaría relacionada con la estructura química de la molécula en cuestión, su grado de protección mediante encapsulamiento y la temperatura de almacenamiento.

5.7.- Viabilidad económica

La viabilidad económica del uso de aditivos en alimentación animal depende no solo del coste del aditivo sino también de la dosis requerida para que se produzca un efecto cuyo beneficio supere al coste de su uso (Benchaar y Greathead, 2011). Un ejemplo de este tipo de análisis lo realizó Doreau et al. (2014) para el sector vacuno francés en el período 2010-2030 empleando dos estrategias nutricionales para reducir metano entérico: i) adición de grasas insaturadas y ii) uso de nitratos.

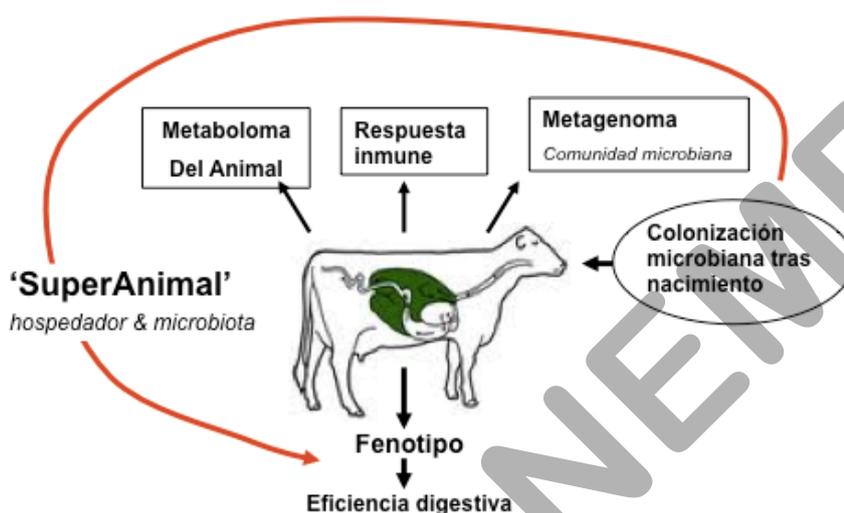
6.- INTERVENCIONES EN EDADES TEMPRANAS

En contraposición a la resistencia del ecosistema microbiano a ser alterado en el animal adulto, el animal pre-rumiante ofrece una oportunidad de intervención durante el proceso primero de colonización tras el nacimiento. La rumia requiere aproximadamente 2 meses en establecerse de manera funcional en el rumiante joven. El desarrollo del rumen consta de 3 procesos paralelos e interconectados: i) desarrollo del órgano per se, del epitelio y de su masa muscular (Reynolds et al., 2004), ii) desarrollo de la funcionalidad en relación a su la fermentación anaerobia y la actividad enzimática (Rey et al., 2012) y iii) la colonización microbiana por bacterias, protozoos, hongos, virus y arqueas (Fonty et al., 1987).

El rumen es colonizado en la primera semana de vida, mucho antes de que comience la ingesta de alimento sólido, y que alcanzan concentraciones similares a las del

rumen adulto tras el primera mes de vida (Yáñez-Ruiz et al., 2015). Esta colonización tan temprana representa una oportunidad de intervención en cuanto a la ocupación de distintos nichos ecológicos, asumiendo que hasta que el ecosistema se coloniza y estabiliza hay una ventana de tiempo con una alta PLASTICIDAD que permita cierta manipulación y, sobre todo, que los cambios producidos permanezcan en el animal adulto (Figura 3).

Figura 3.- Concepto de programación microbiana del rumen.



En España podemos distinguir dos sistemas distintos de manejo alimenticio de las crías en vacuno. En ganado de engorde la mayor parte de la carne de vacuno procede de animales jóvenes sacrificados a los 8-10 meses de edad con un peso de 350-400 kg en razas precoces y lecheras en las que la cría se separa de la madre tras el nacimiento y se le alimenta con lactoreemplazante, y de 12 meses y 450-500 kg en razas cárnicas con animales pasteros criados en lactancia natural con sus madres (García-Rebollar et al., 2008). En ganado lechero (de grandes y pequeños rumiantes), las hembras de recría se separan igualmente de la madre y se alimentan con lactoreemplazante. El grupo de investigación de la Estación Experimental del Zaidín ha descrito recientemente que el patrón de colonización microbiana es muy distinto entre lactancia NATURAL (con la madre) y ARTIFICIAL (con lactoreemplazante y aislados de animales adultos) (Abecia et al., 2014). Por tanto, cualquier estrategia de intervención en edades tempranas debe considerar ambos sistemas, puesto que el alcance y persistencia de los efectos pueden variar significativamente. Así, hemos descrito recientemente el potencial de diversas estrategias nutricionales aplicadas en edades tempranas para reducir la producción de metano mediante el uso de compuestos de síntesis (Abecia et al., 2013) y la incidencia de acidosis tras la administración de cultivos vivos de levaduras (Abecia et al., 2016) en los animales cuando alcanzan la edad adulta y su etapa productiva. Durante las jornadas se presentarán los trabajos que se están llevando a cabo en la actualidad.

7.- CONCLUSIONES

La complejidad del ecosistema microbiano del rumen representa un desafío para una modulación exitosa desde el punto de fisiológico y comercial. Sin embargo, el mejor conocimiento de dicho ecosistema, de la naturaleza de los distintos compuestos que pueden ejercer efectos beneficiosos y del impacto sobre la fisiología del rumiantes están ayudando a desarrollar estrategias nutricionales exitosas. La modificación de la microbiota ruminal cuando el rumen está en su fase de desarrollo ofrece un interesante potencial para ‘programar’ la composición de dicho ecosistema y conseguir animales más eficientes en edad adulta.

8.- AGRADECIMIENTOS

Este trabajo recoge parte de la actividad investigadora que se está desarrollando en el proyecto BFU2014-57964-R.

9.- REFERENCIAS

- ABECIA, L., MARTÍN-GARCÍA, A.I., MARTÍNEZ, G., NEWBOLD, C.J. y YAÑEZ-RUIZ, D.R. (2013) *J. Anim. Sci.* 91: 4832-40
- ABECIA, L., WADDAMS, K.E., MARTÍNEZ-FERNANDEZ, G., MARTÍN-GARCÍA, A.I., RAMOS-MORALES, E., NEWBOLD, C.J. y YAÑEZ-RUIZ, D.R. (2014) *Archaea* 6: 841463.
- ABECIA et al. (2016)
- ASCHENBACH, J.R., PENNER, G.B., STUMPF, F. y GÄBEL, G. (2011) *J Anim Sci.* 89: 1092-107.
- BACH, A., CALSAMIGLIA, S. y STERN, M.D. (2005) *J Dairy Sci.* 88 Suppl 1: E9-21.
- BEAUCHEMIN, K.A., KREUZER, M., O’MARA, F. y MCALLISTER, T.A. (2008) *Australian Journal of Experimental Agriculture* 48(2): 21-27.
- BEAUCHEMIN, K., MCALLISTER, T. y MCGINN, S. (2009) *Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources* 4(035): 1-18.
- BENCHAAR, C. y GREATHEAD, H. (2011) *Anim. Feed Sci. Technol.* 166-167: 338-355.
- CALSAMIGLIA, S., BUSQUET, M., CARDOZO, P.W., CASTILLEJOS, L. y FERRET, A. (2007) *J. Dairy Sci.* 90(6): 2580-2595.
- CARDOZO, P., CALSAMIGLIA, S., FERRET, A. y KAMEL, C. (2004) *J. Anim. Sci.* 82(11): 3230.
- CARDOZO, P., CALSAMIGLIA, S., FERRET, A. y KAMEL, C. (2005) *J. Anim. Sci.* 83(11): 2572.
- DENG, W., D. XI, H. MAO, y WANAPAT, M. (2008) *Molecular Biology Reports* 35(2): 265-274.

- DOREAU, M., BAMIÈRE, L., PELLERIN S., LHERM, M. y BENOIT, M. (2014) *Anim. Prod. Sci.* 54: 1417-1422.
- DUVAL, S.M., MCEWAN, N.R., GRAHAM, R.C., WALLACE, R.J. y NEWBOLD, C.J. (2007) *J. Appl. Microbiol.* 103(6): 2132-2141.
- EDWARDS, J.E., MCEWAN, N.R., TRAVIS, A.J. y WALLACE, R.J. (2004) *Antonie Van Leeuwenhoek* 86(3): 263-281.
- FONTY, G., GOUET, P. y JOUANY, J.-P. (1987) *J. Gen. Microbiol.* 133: 1835-1843.
- GARCÍA-REBOLLAR, P., BACHA-BAZ, F. y JIMENO-VINATEA, V. (2008) En: *Producción de ganado vacuno de carne y tipos comerciales en España*. C. Sañudo Astiz, V. Jimeno Vinatea, M. Cerviño López (edit.). Schering-Plough. pp. 75-88.
- HALLIER, A., NOIROT, V., MEDINA, B., LEBOEUF, L. y CAVRET, S. (2013) *J. Dairy Sci.* 96(3): 1447-1454.
- HART, K.J., YÁÑEZ-RUIZ, D.R., DUVAL, S.M., MCEWAN, N.R. y NEWBOLD, C.J. (2008) *Anim. Feed Sci. Technol.* 147(1-3): 8-35.
- JAMI, E. y MIZRAHI, I. (2012) *PLoS One* 7: e33306.
- JOHNSON, K.A. y JOHNSON, D.E. (1995) *J. Anim. Sci.* 73(8): 2483-2492.
- KAMRA, D. (2005) Rumen microbial ecosystem. *Current Science* 89(1): 124-135.
- KLEVENHUSEN, F., ZEITZ, J.O., DUVAL, S., KREUZER, M. y SOLIVA, C.R. (2011) *Anim. Feed Sci. Technol.* 166-167(0):356-363.
- LEY, R.E., PETERSON, D.A. y GORDON, J.I. (2006) *Cell* 124(4): 837-848.
- MAGRAMA (2011) Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medioambiente.
- MARTIN, C., MORGAVI, D. y DOREAU, M. (2010) *Animal* 4(3): 351-365.
- MARTÍNEZ-FERNÁNDEZ, G., ABECIA, L., MARTÍN-GARCÍA, A.I., RAMOS-MORALES, E., HERVÁS, G., MOLINA-ALCAIDE, E. y YÁÑEZ-RUIZ, D.R. (2013) *Animal* 7: 1925-34
- MATEOS, I., RANILLA, M., TEJIDO, M., SARO, C., KAMEL, C. y CARRO, M.D. (2013) *Anim. Prod. Sci.* 53: 299-307.
- MCALLISTER, T. y NEWBOLD, C.J. (2008) *Aust. J. Experim. Agric.* 48(2): 7-13.
- MCINTOSH, F., WILLIAMS, P., LOSA, R., WALLACE, R., BEEVER, D. y NEWBOLD, C. (2003) *Appl. Environm. Microbiol.* 69(8): 5011.
- MOHAMMED, N., AJISAKA, N., LILA, Z., HARA, K., MIKUNI, K., HARA, K., KANDA, S. y ITABASHI, H. (2004) *J. Anim. Sci.* 82(6): 1839-1846.
- MOLERO, R., IBARS, M., CALSAMIGLIA, S., FERRET, A. y LOSA, R. (2004) *Anim. Feed Sci. Technol.* 114(1): 91-104.
- MOLINA ALCAIDE, E. y YÁÑEZ-RUIZ, D.R. (2008) *Anim. Feed Sci. Technol.* 147: 247-264.
- MORGAVI, D., FORANO, E., MARTIN, C. y NEWBOLD, C.J. (2010) *Animal* 4(07): 1024-1036.
- OHENE-ADJEI, S., CHAVES, A., MCALLISTER, T., BENCHAAAR, C., TEATHER, R. y FORSTER, R. (2008) *Microbial Ecology* 56(2): 234-242.
- REY, M., ENJALBERT, F. y MONTEILS, V. (2012) *J. Dairy Sci.* 95: 1500-1512.
- REYNOLDS, C., DÜRST, B. y LUPOLI, B. (2004) *J. Dairy Sci.* 87: 961-971.

- SOLIVA, C.R., AMELCHANKA, S.L., DUVAL, S.M. y KREUZER, M. (2011) *Br. J. Nutr.* 106(01): 114-122.
- SOTO, E., YAÑEZ-RUIZ, D., CANTALAPIEDRA-HIJAR, G., VIVAS, A. y MOLINA-ALCAIDE, E. (2012) *Anim. Prod. Sci.* 52(9): 813-822.
- SOTO, E., MOLINA-ALCAIDE, E., KHELIL, H. y YAÑEZ-RUIZ, D. (2013) *Anim. Feed Sci. Technol.* 185: 9-18
- TORNAMBÉ, G., CORNU, A., PRADEL, P., KONDOYAN, N., CARNAT, A., PETIT, M. y MARTIN, B. (2006) *J. Dairy Sci.* 89(6): 2309-2319.
- VIALONINISTA, C., MARTIN, B., VERDIER-METZ, I., PRADEL, P., GAREL, J.-P., COULON, J.-B. y BERDAGUÉ, J.-L. (2000) *Le lait* 80(6):635-641.
- WALLACE, R.J., MCEWAN, N.R., MCINTOSH, F.M., TEFEREDEGNE, B. y NEWBOLD, C.J. (2002) *Asian Austr. J. Anim. Sci.* 15(10):1458-1468.
- WANG, Y., MCALLISTER, T.A., YANKE, L.J., XU, Z.J., CHEEKE, P.R. y CHENG, K.J. (2000) *J. Sci. Food Agric.* 80(14): 2114-2122.
- YAÑEZ-RUIZ, D.R., MOUMEN, A., MARTIN GARCIA, I.A. y MOLINA ALCAIDE, E. (2004) *J. Anim. Sci.* 82:2023-2032.
- YAÑEZ-RUIZ, D.R., ABECIA, L. y NEWBOLD, C.J. (2015) *Front Microbiol.* 6: 1133.
- YAÑEZ-RUIZ, D.R., BANNINK, A., DIJKSTRA, J., KEBREAB, E., MORGAVI, D.P., O'KIELY, P., REYOLDS, C.K., SCHWARM, A., SHINGFIELD, K.J. y YU, Z. (2016) *Anim. Feed Sci. Technol.* 216: 1-18.
- YU, Z., YU, M. y MORRISON, M. (2006) *Environmental Microbiology* 8(4):603-611.
- ZHOU, M., HERNANDEZ-SANABRIA, E. y GUAN, L.L. (2010) *Appl. Environ. Microbiol.* 76(12): 3776-3786.