



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI UDINE

Dottorato di Ricerca in Scienze e Biotecnologie Agrarie
Ciclo XXVII
Coordinatore: prof. Mauro Spanghero

TESI DI DOTTORATO DI RICERCA

**Design and application of a stratified continuous
rumen fermentation system**

DOTTORANDO
dott. Federico Mason

SUPERVISORE
prof. Mauro Spanghero

ANNO ACCADEMICO 2014/2015

In the first half of the twentieth century several ruminal in vitro systems were developed. These systems can be classified as “batch culture” or “continuous culture”.

The continuous culture systems (CC) had a quite complex evolution process, and those nowadays used are classified as RUSITEC, Dual Flow Continuous Culture (DFCC) or Single Flow Continuous Culture (SFCC). The diverse CC are characterized by having different design and different working settings, such as: volume and shape of the fermentation vessel, stirring device, artificial saliva, solid and liquid flow and dilution rate, volume and origin of the rumen inoculum, feeding practice and device.

On the bases of the characteristics of the already existing ruminal continuous cultures, a stratified continuous culture has been developed at the Laboratory of Nutrition of the Department of Agricultural and Environmental Sciences of University of Udine. This system has the peculiarity of a simple design and of being built by using cheap and readily available materials. The CC consists of 8 x 2 L glass bottles, warmed at 39°C and placed on a water proof magnetic stirrer. The bottles are closed with a rubber stopper, provided with an insert for the inflow of artificial saliva, and have the outflow at the base.

A first trial has been made to test the stratified continuous culture. In particular, the capability of maintaining protozoa populations and reduce the accumulation of undigested material was investigated in two separated experiments. In Experiment 1 was evaluated the effect of two stirring frequencies (continuous vs intermittent) and two dilution rates (D, 1.29 vs 1.04) on the pH values and on the counts of the protozoa in the fermentation fluid. Experiment 2 aimed to test the effects of varying the daily diet amount (15, 20, 25, 30 g DM/d of a diet with 50:50 forage: concentrate ratio) on the organic matter digestibility and on the fermentative patterns. In 2 fermentation runs of 8 d each, bottles were inoculated with 450 ml of rumen fluid and 1050 ml of artificial saliva, which was then pumped at a rate of 78 ml/h. The tested CC reached stable conditions of fermentation after some days of adaptation and maintained an acceptable concentrations of the protozoa population till the end of the trial. The results of the second experiment suggest that the amount of feed administered to the fermenters has to be properly chosen to limit the accumulation of undigested materials in the glass bottles and maintain the fermentation patterns within acceptable ranges.

A second trial was organized with the aim to understand the effect of urea administration on the fermentation parameters; the trial consisted in two experiments. In the first experiment, a specified dose of urea was used to simulate the regular release of nitrogen in the rumen in a continuous fermenter environment. The aim was to study the rumen metabolism at controlled

defined conditions of release of nitrogen, to identify the conditions of the optimal matching between nitrogen release and the rumen bacterial degradation of the carbohydrate fraction. The experiment consisted of 2 runs of 7 days each (4 adaptation days and 3 measuring days). The fermenters were supplied with 12 g DM/d of a diet containing corn silage (30% DM), hay (10% DM), dry corn (50% DM) and a mineral vitamin supplement (10% DM), divided in two equal portions at 09:00 and 15:00. The urea supplement was administered in 1, 2, 3 or 4 doses at 1 hour intervals. The second experiment, performed at the Ruminant Nutrition Laboratory of Utah State University, investigated the effects of supplementing slow-release urea (**SRU**; Optigen, Alltech, Nicholasville, KY) in 3 lactation dairy diets with different forage-to-concentrate ratios (**F:C**) on *in vitro* ruminal fermentation characteristics. The experiment was performed in 4 independent runs of continuous cultures. Each fermenter was offered a diet of 20 g DM/d in 2 equal portions at 08:00 and 20:00 h. In both experiments variations of pH values were detected with the administration of urea at doses usually utilized in ruminant diets and in the range of rumen acidity. In experiment 1, high concentrations of rumen ammonia increased propionate with a tendency of reducing the acetate:propionate ratio. Moreover, in experiment 2, the substitution of fiber from forages with that of byproducts in diets determined a reduction of the ammonia accumulation with a reduction in buffering the rumen; a reduction of the acetate concentrations and an increase in propionate concentrations and a reduction of the methane yield.

The third trial aimed to test the effects of increasing the dose of an active dry *Saccharomyces cerevisiae* on rumen metabolism in a rumen continuous culture system. The fermenters were supplied with 12 g DM/d of a diet containing corn silage (20% DM), hay (10% DM), alfalfa hay pellet (20% DM), and a compound feed (50% DM), divided in 2 equal portions at 9:00 and 16:00. At each feeding time, all the fermenters received a supplement (0.025 g per feeding) consisting of a commercial yeast extract and/or soybean meal in differing ratios Y:S (0:500, Y0; 5:495, Y5; 50:450, Y50; 500:0, Y500). In the present trial, for several measurements, such as pH, ammonia, and some protozoa numbers, a significant difference between control and yeast inclusion treatments were detected, but there was no dose-treatment effect, even though the doses of yeast followed an exponential rate of increase. A possible explanation of the lack of differences between yeast doses could be because of the favorable *in vitro* conditions for their survival and multiplication of the yeast (e.g. high pH values, reducing conditions, etc.) which could have favored the colonization of the fermentation bottles to a similar level, independently of the initial dose of yeast.

In general, the stratified continuous fermenter was able to reproduce the ruminal environment in a way to detect even small differences in the parameters measured as a consequence of the diets tested. In the experiments were measured mainly the basic fermentative parameters (pH, VFA, NH₃, digestibility), with the future aim to integrate these analysis with technics of molecular biology, to better study the ruminal microbial population.

List of abbreviations

°C	Celsius Degrees
µm	Micrometer
ADF	Acid Detergent Fibre
anhyd	Anhydrous
ARISA	Automated Ribosomal Intergenic Spacer Analysis
B	Daily Buffer Volume
CaCl₂	Calcium Chloride
CC	Continuous Culture Fermenters
CH₄	Methane
cm	Centimeter
CP	Crude Protein
D	Dilution Rate
d	Day
DDGS	Dried Distillers Grains with Solubles
DFCC	Dual Flow Continuous Culture
DGGE	Denaturing Gradient Gel Electrophoresis
dig	Digestibility
dl	Deciliter
DM	Dry Matter
DNA	Deoxyribonucleic Acid
F	Daily food quantity
g	Grams
h	Hour
KCl	Potassium Chloride
KHCO₃	Potassium Bicarbonate
l	Liter
mg	Milligram
MgCl₂	Magnesium Chloride
MgSO₄	Magnesium Sulfate
ml	Milliliter
mm	millimeter
mM	Millimolar
MOEFF	Microbial Efficiency
N	Normal
N-	Nitrogen
Na₂HPO₄	Disodium Phosphate
NaCl	Sodium Chloride
NaH₂PO₄	Monosodium Phosphate
NaHCO₃	Sodium Bicarbonate
NDF	Neutral Detergent Fibre

NFC	Nonfibrous Carbohydrates
NH₃	Ammonia
nm	Nanometer
NH₄⁺	Ammonium Ion
NSC	Nonstructural Carbohydrates
OM	Organic Matter
PB	Purine Base
PCR	Polymerase Chain Reaction
RDP	Rumen Degradable Protein
RNA	Ribonucleic Acid
rH	Clark's Exponent
rpm	Revolutions Per Minute
SBM	Soybean Meal
SFCC	Single Flow Continuous Culture
T-RLFP	Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism
VF	Fermentation Volume
VFA	Volatile Fatty Acids
VI	Inoculum Volume

Sommario

1	Prefazione	1
2	Introduzione e obiettivi	2
2.1	Evoluzione e classificazione dei sistemi di fermentazione ruminale in continuo.	2
2.2	Descrizione dei sistemi di fermentazione ruminale continui.....	4
2.2.1	Dimensione e forma dei fermentatori e sistemi di agitazione	4
2.2.2	Tipo di soluzione (buffer) e turn over	7
2.2.3	Volume e origine dell'inoculo ruminale iniziale.....	9
2.2.4	Alimentazione dei fermentatori.....	11
2.2.5	Articolazione delle prove, disegni sperimentali e rilievi.....	13
2.2.6	Confronto tra CC e sistemi "Batch"	14
2.2.7	Confronto con la sperimentazione <i>in vivo</i>	16
2.3	Obiettivi.....	17
2.4	Bibliografia.....	26
3	Risultati	36
3.1	Progettazione e costruzione del sistema di fermentazione	36
3.2	Testing a stratified continuous rumen fermenter system.....	39
3.3	Continuous culture system fed with urea partitioned in different administrations or added in slow form to different fiber diets.	55
3.4	Effect of increasing doses of an active dry <i>Saccharomyces cerevisiae</i> on rumen metabolism in a rumen continuous culture system.....	76
4	Commenti e conclusioni	90

1 Prefazione

La prima parte della tesi presenta una review bibliografica (Capitolo1) che illustra brevemente la storia ed evoluzione dei sistemi di fermentazione ruminale in continuo, ed una descrizione delle caratteristiche strutturali e operative di questi sistemi. La seconda parte (Capitolo 2) descrive il processo attraverso il quale è stato realizzato il sistema di fermentazione, le sue caratteristiche e le prove atte ad individuare le condizioni di incubazione adatte al sistema; illustra inoltre gli esperimenti applicativi nei quali è stato utilizzato il nuovo fermentatore in continuo: la prima prova aveva l'obiettivo di valutare l'effetto dell'aggiunta di urea slow release in diete per bovini sui parametri di fermentazione e l'efficienza microbica; la seconda prova mirava a valutare l'influenza dell'aggiunta di lievito in 3 dosi diverse sulla fermentazione e sulla popolazione microbica ruminale.

La tesi termina con le conclusioni generali (Capitolo3) sulla funzionalità del sistema di fermentazione in continuo.

2 Introduzione e obiettivi

2.1 Evoluzione e classificazione dei sistemi di fermentazione ruminale in continuo.

Dalla prima metà del ventesimo secolo sono stati sviluppati numerosi sistemi di fermentazione ruminale *in vitro*, raggruppabili principalmente in due categorie in base alla loro funzionalità. La prima categoria si basa sostanzialmente su sistemi chiusi ideati per studi di breve termine (sistemi “Batch”); racchiude le tecniche *in vitro* in grado di misurare la degradabilità di un substrato alla fine di un processo fermentativo, e stimare o predire il valore nutritivo di un alimento, basandosi per esempio su cinetica e volume di produzione dei gas di fermentazione (Menke e Steingass., 1988), sulla degradazione della sostanza secca e sostanza organica (Tilley and Terry, 1963) o dell’NDF (Daisy Incubator). La seconda categoria racchiude i sistemi che riproducono i processi metabolici ruminanti di utilizzazione dei nutrienti, e include i sistemi di fermentazione in continuo (CC), progettati per studi di lungo termine (Minson, 1998; Tamminga e Williams, 1998).

Non è semplice individuare una chiara linea evolutiva dei sistemi di fermentazione *in vitro*, in quanto molteplici sono stati i tentativi di realizzazione di sistemi che simulassero al meglio l’ambiente ruminale e permettessero di riprodurre i suoi processi fermentativi. In generale, si può evidenziare come i CC si sono differenziati dai “Batch” evolvendosi da sistemi primordiali nei quali il liquido ruminale veniva incubato assieme a diverse soluzioni minerali, per studiare per esempio il processo di digestione della cellulosa (Woodman e Evan, 1938), la produzione di gas da fermentazioni di differenti carboidrati (Quin, 1943) e l’utilizzazione dell’urea da parte di microrganismi ruminanti (Pearson e Smith, 1943). Da questi primordiali sistemi e da quelli di molti altri autori (Marston 1948; Louw et al., 1949; Burroughs et al., 1950) si sviluppò il ramo dei cosiddetti sistemi di fermentazione *in vitro* “all-glass”.

Warner nel 1956 tentò di classificare questi nuovi sistemi *in vitro* sviluppati in quegli anni, basandosi sull’inoculo utilizzato e sulla permeabilità del sistema; individuò così 4 categorie:

- a. Liquido ruminale non diluito o a bassa diluizione, incubato con un substrato in un sistema impermeabile “all-glass” (Pearson e Smith, 1943; Quin, 1943; Gray et al., 1951).

- b. L'intero contenuto ruminale (frazione solida e liquida) viene diluito con saliva artificiale ed incubato con un substrato in un sistema impermeabile (Burroughs et al., 1950).
- c. Inoculo derivato dalla separazione dei microorganismi dal liquido ruminale originale, ed incubato in un sistema impermeabile, ad es. liquido ruminale defaunato (McNaught, 1951) o una sospensione dei microorganismi ruminali in una soluzione minerale (Marston, 1948).
- d. Liquido ruminale intero incubato con un substrato in un contenitore semipermeabile, dializzato contro una soluzione minerale (Louw et al., 1949; Hutanen e Gall, 1952; Wasserman et al., 1952).

Si possono considerare i fermentatori di quest'ultima categoria come dei primordiali sistemi di fermentazione in continuo, in quanto risultato di modifiche apportate ai sistemi "Batch", riducendo l'accumulo dei prodotti di fermentazione tramite una membrana di dialisi (Louw et al., 1949), o creando un flusso di liquido di fermentazione per permettere la crescita continua dei microorganismi ruminali (Adler et al., 1958).

Più tardi, nel 1976, Czerkowsky propose una nuova classificazione dei sistemi che lui definisce "rumini artificiali", delineando ancor di più la differenziazione tra i sistemi chiusi e quelli a flusso aperto, ed individuando 3 categorie principali:

- a. Sistema "Bulk": è un contenitore in vetro fornito di un valvola Bunsen per il rilascio dei gas di fermentazione. Può prevedere anche una somministrazione di gas direttamente nel liquido di fermentazione, permettendo così una blanda azione di mescolamento. Spesso il gas viene raccolto e analizzato. Questo tipo di apparato permette esperimenti di breve termine.
- b. Sistema a flusso continuo: la soluzione buffer, contenente anche l'alimento, viene distribuita in continuo nel vaso di reazione, e una parte del liquido di fermentazione viene pompata fuori, o lasciata uscire per tracimazione. Richiedendo del tempo per raggiungere una situazione di stabilità, questo apparato non è adatto ad esperimenti di breve termine.
- c. Sistema semipermeabile: secondo l'autore, questa è la categoria che meglio simula la fisiologia ruminale, avendo un liquido di reazione con un flusso di diluizione continuo grazie all'apporto di una soluzione tampone pompata nella bottiglia di fermentazione. A causa della complessità di struttura e ai numerosi problemi che questa rappresenta (come la probabilità di perdite, la difficoltà di reperire una

membrana semi-permeabile sufficientemente resistente, la difficoltà di controllo dei flussi) non è facile effettuare prove sperimentali con questa tipologia di sistema.

Dalla classificazione di Czerkawsky (1976) si intuisce chiaramente la linea funzionale e strutturale (rappresentata dai sistemi a flusso continuo e dai sistemi semipermeabili) che viene mantenuta nei sistemi di fermentazione in continuo ancora oggi utilizzati e che viene in parte ripresa nella classificazione proposta da Miettinen e Setälä nell'1989:

- a. RUSITEC: sistema nel quale l'alimento viene incubato e trattenuto in sacchetti di poliestere e sostituiti periodicamente (Czerkawski e Breckenridge, 1977);
- b. Fermentatori in continuo a due uscite (DFCC): sistema nel quale l'alimento solido viene somministrato al fermentatore, e i flussi solido e liquido vengono gestiti separatamente (Hoover et al., 1976);
- c. Fermentatori in continuo ad un'unica uscita (SFCC): sistemi nel quale l'alimento solido viene somministrato al fermentatore, e il volume del liquido di fermentazione viene mantenuto costante eliminando il liquido in eccesso per tracimazione.

2.2 Descrizione dei sistemi di fermentazione ruminale continui

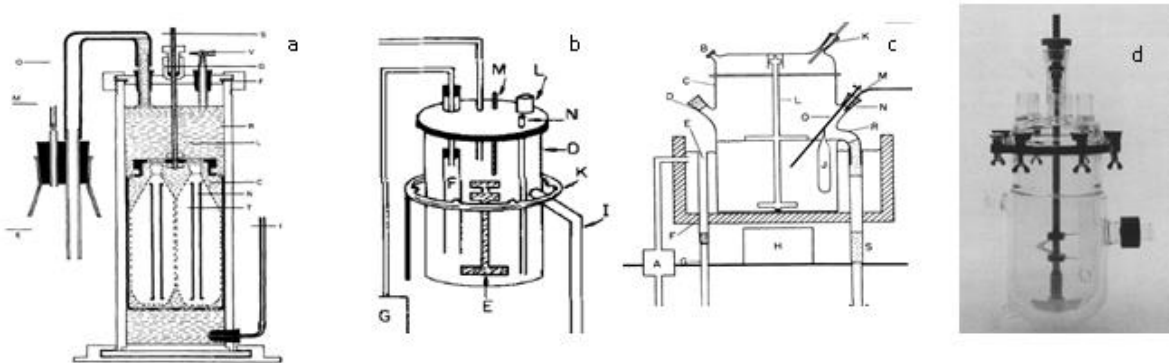
La tabella1 riassume un lavoro di meta-analisi effettuato per confrontare le condizioni di incubazione ed i parametri fermentativi di prove sperimentali attuate con sistemi di fermentazione ruminale in continuo. Per questa analisi è stato utilizzato un totale di 44 studi (comprendenti le tre tipologie di CC; RUSITEC, DFCC e SFCC) pubblicati in riviste referizzate dal 2000 al 2014. I parametri considerati, estrapolati dalle pubblicazioni ed uniformati per unità di misura, sono: il volume di fermentazione (VF), il volume di liquido ruminale utilizzato come inoculo (VI), la quantità di alimento giornaliera (F), la quantità di saliva apportata giornalmente (B), il tasso di diluizione (D) espresso come B/VF , il rapporto tra alimento e quantità di saliva al giorno (F/B), la durata della prova (giorni di adattamento + giorni di campionamento) ed i rilievi sperimentali effettuati.

Come si è visto dalla classificazione di Miettinen e Setälä (1989), i CC si distinguono principalmente in base alla loro struttura. Di seguito verranno illustrate le caratteristiche di design delle tre tipologie, e i parametri presi in considerazione nella meta-analisi.

2.2.1 Dimensione e forma dei fermentatori e sistemi di agitazione

Figura 1. Confronto dei vasi di fermentazione tra le diverse tipologie di CC.

^aCzerkawski e Breckenridge, 1977; ^bHoover et al., 1976; ^cSlyter et al., 1964; ^dTeather e Sauer, 1988.



- a. RUSITEC (Czerkawski e Breckenridge, 1977; figura 1a): il vaso di fermentazione consiste in un cilindro in Plexiglass (25,4x7,6 cm), della capacità di 1 litro, coperto da un tappo a vite, piatto, provvisto di due fori, uno per il campionamento ed uno per l'uscita dell'effluente. Dentro al vaso di fermentazione c'è un recipiente contenente dei nylon bag con l'alimento. Questo viene agitato dentro al vaso di fermentazione tramite dei movimenti verticali effettuati da un motore esterno al vaso. Il design di questo sistema è stato scelto dagli autori perché risponde a determinati requisiti:
- Il vaso di fermentazione deve includere sia la fase solida, sia la fase liquida, il contenuto deve essere ben mescolato, ma non deve risultare troppo omogeneo.
 - Il vaso di fermentazione deve essere a chiusura ermetica in modo da poter trattenere e successivamente campionare i gas prodotti.
 - L'apparato deve funzionare in modo sicuro e continuo senza interruzioni per 4-8 settimane, e deve essere di semplice costruzione.
- b. Fermentatori continui a due uscite (Hoover et al., 1976; figura 1b): il vaso di fermentazione è costituito da un cilindro di vetro della capacità di 4 litri. A $\frac{3}{4}$ di altezza del vaso si trova l'uscita dell'effluente per la tracimazione del fluido di fermentazione (fase liquida e solida assieme), permettendo un volume di fermentazione di 2277 ml e un volume gassoso di 1723 ml. In aggiunta a questa uscita, il vaso è equipaggiato da un filtro per l'estrazione di solo liquido di fermentazione, regolando così separatamente i tassi di uscita liquido e solido (dual flow). Il fluido di fermentazione viene agitato da una pala azionata da un motore magnetico, posizionata ad un'altezza tale da fungere anche da rompi-schiuma. Nel

1986 Hannah et al. hanno presentato una versione modificata di questo sistema, diminuendo il volume del vaso di fermentazione (1030 ml), e cambiando il sistema di riscaldamento usato.

c. Fermentatori continui ad una uscita:

- (Slyter et al., 1964; figura 1c) il vaso di fermentazione (1l di capacità) è provvisto di un tubo a metà altezza, che garantisce l'uscita del liquido di fermentazione per tracimazione, mantenendo costante il volume di fermentazione (500 ml). Il liquido di fermentazione viene miscelato da una pala metallica, azionata da un motore magnetico. Da questo sistema deriva quello ideato da Miettinen e Setälä (1989).
- Nel 1988 Teather e Sauer progettaronο un fermentatore in continuo ad una uscita (figura 1d), la cui unità fermentativa è rappresentata da un vaso di fermentazione in vetro (1,4 l) con fondo sferico; il vaso è provvisto di un'intercapedine di riscaldamento e di un'uscita per tracimazione che mantiene il volume di fermentazione a 700 ml. Questa uscita è a sua volta equipaggiata da un inserto a "T" che permette la fuoriuscita del liquido che si trova sul fondo del vaso, favorendo la naturale stratificazione del materiale di fermentazione. Il liquido di fermentazione viene agitato da un'elica controllata da un motore esterno. Il vaso è sigillato ermeticamente da un tappo provvisto di numerosi fori, dedicati alle misure (pH) ed ai prelievi (di liquido e gas), all'aggiunta di alimento e infusione della saliva artificiale. Nel 2009 Muetzel et al. modificarono l'uscita dell'effluente di questo sistema rimuovendo l'inserto a "T" e cambiando l'inclinazione del tubo di tracimazione (da 90° a 45°) per risolvere i problemi di accumulo della DM all'interno del vaso di fermentazione e l'inconveniente dell'otturazione del tubo di uscita. Gli autori sostennero inoltre che, nonostante le modifiche, il nuovo design ha permesso di mantenere la formazione del cappello fibroso tipico del sistema descritto da Hoover et al. (1976), e fattore fondamentale per la sopravvivenza dei protozoi all'interno del vaso di fermentazione.
- Meng et al. (1999) realizzarono un sistema di fermentazione in continuo ad un'unica uscita, la cui unità fermentativa è costituita da un contenitore in policarbonato, della capacità di 2 l, con un'uscita per l'effluente che mantiene un volume di fermentazione di 1460 ml. Il contenitore viene chiuso con un coperchio con diversi fori (per l'introduzione di gas, saliva artificiale e alimento, e per

l'inserimento della sonda del pH). Il liquido di fermentazione viene miscelato da un agitatore magnetico.

Come si può capire da questa descrizione, il design di forma cilindrica è comune a tutti i vasi di fermentazione, in quanto sembra essere essenziale per la miscelazione di tutto il liquido di fermentazione.

Un altro parametro fondamentale nel design dei vasi di fermentazione è la posizione del foro di uscita per il liquido effluente. Nel caso del RUSITEC (Czerkawski e Breckenridge, 1977), del sistema di Hoover et al. (1976) e del sistema di Slyter et al. (1964), il design del vaso di fermentazione permette l'uscita del liquido che si trova nella parte superiore, mentre il sistema di Teather e Sauer (1988), e successivamente quello di Muetzel et al. (2009) permettono l'uscita del liquido di fermentazione che si trova nella metà bassa del vaso, quindi quello contenente la parte già degradata di alimento, rendendo così possibile la formazione di un cappello fibroso in superficie (situazione più riconducibile all'ambiente ruminale reale).

I vasi di fermentazione, inoltre sono dotati di almeno una porta per effettuare i prelievi e somministrare l'alimento; negli apparati più complessi il numero di porte è maggiore, in quanto deve permettere allo stesso tempo l'introduzione di sonde (pH, temperatura, potenziale redox), l'apporto della saliva artificiale e fornire accessi per i prelievi (sia di gas che di liquido di fermentazione). La complessità del design è inoltre influenzata dal sistema di miscelazione adottato, che può essere costituito da motori esterni che tramite delle barre in acciaio inox muovono il contenitore dell'alimento (RUSITEC) o delle eliche di miscelazione (Teather e Sauer, 1988), oppure da sistemi agitazione magnetica (Slyter et al., 1964, Hoover et al., 1976; Miettinen e Setälä, 1989; Meng et al., 1999).

2.2.2 Tipo di soluzione (buffer) e turn over

In un sistema di fermentazione *in vitro* la saliva artificiale (o soluzione tampone) ha la funzione di mantenere un ambiente adeguato per i processi fermentativi, fornendo nutrienti e agendo da tampone per mantenere un pH costante (Mould et al., 2005).

Nei sistemi di fermentazione in continuo le principali soluzioni tampone utilizzate sono le seguenti (tabella 3):

- a. McDougall (1948): ha studiato le secrezioni salivari di pecora, determinandone la composizione chimica, la DM, il tasso di produzione e il pH; ha quindi poi stilato il protocollo per preparare artificialmente una saliva a questa comparabile.
- b. Slyter et al. (1966): partendo dalla soluzione McDougall (diluata 3:2 con acqua di rubinetto), hanno studiato l'effetto della sostituzione della soluzione tampone di partenza (fosfato-carbonato) con una solo a base di fosfato sui parametri di fermentazione e diversi livelli di pH.
- c. Weller and Pilgrim (1974): partendo dal lavoro di Aafjes e Nijhof (1967), che determinarono la composizione salivare di bovino, aggiunsero a questa dell'urea in soluzione per simulare il riciclo dell'azoto.

Nei CC la saliva artificiale viene pompata continuamente, il più delle volte ad un tasso costante, all'interno del vaso di fermentazione. Dai dati raccolti dalla letteratura (tabella 1) si nota come il tasso di infusione della soluzione tampone sia molto variabile tra i diversi studi e altamente influenzato dalla tipologia di sistema, risultando in un range di valori piuttosto ampio (719,7 ml/d, RUSITEC; 3273,0 ml/d, DFCC; 1632,3 ml/d, SFCC); questo parametro da solo però non è sufficiente a confrontare i diversi studi in quanto deve essere rapportato al volume di fermentazione del sistema utilizzato. Effettuando quindi il rapporto tra il volume del liquido di fermentazione (VF) e la quantità di saliva artificiale apportata giornalmente (B) si determina il tasso di diluizione (D). D rappresenta quindi il coefficiente di sostituzione (o appunto diluizione) del liquido di fermentazione in 24h, perciò se avessimo per esempio un VF pari a 700 ml ed un B pari a 700 ml/d, D sarebbe uguale ad 1.

Non esiste un valore assoluto di D da mantenere durante una prova *in vitro*. Come evidenzia la meta-analisi effettuata (tabella1), questo parametro è molto variabile (da 0,5 a 1,7 per RUSITEC; da 2,4 a 3,1 per i DFCC; da 0,7 a 3,7 per i SFCC), situazione evidenziata anche dalla meta-analisi effettuata da Hristov et al. (2012), che sottolinea inoltre come i valori di D per i CC siano nettamente inferiori rispetto alla situazione *in vivo* (3%/h, RUSITEC; 6%/h non-RUSITEC; 8-16%/h, *in vivo*). Questo dipende dalla necessità di mantenere *in vitro* un range più contenuto: non è possibile ridurre sotto un certo limite D in quanto causerebbe un accumulo dei prodotti finali di fermentazione (che normalmente verrebbero assorbiti dalla parete ruminale, mentre in condizioni *in vitro* il loro turnover dipende dal flusso del liquido di fermentazione); all'opposto, un valore di D elevato, che tendenzialmente potrebbe risolvere i problemi legati all'accumulo,

risulterebbe dannoso per la sopravvivenza della popolazione microbica (Abe e Kumeno, 1973; Hoover et al., 1976), richiederebbe elevate quantità di saliva artificiale e la necessità di un controllo del pH per bilanciare la capacità tampone della saliva entrante.

Proprio per questo, diversi autori hanno cercato di stabilire un intervallo adeguato da adottare per i sistemi di fermentazione in continuo.

Martinez et al.(2009) in un RUSITEC ha evidenziato come aumentando D (da 1,2 a 1,7) il pH del liquido di fermentazione si manteneva costante, aumentava la degradabilità della DM, della fibra e della proteina, la produzione di NH_3 e VFA, ma non c'era effetto sulla produzione di metano e la crescita microbica. Hanno quindi concluso che l'aumento di D porta a cambi della popolazione microbica, incrementando la percentuale di batteri fibrolitici e proteolitici.

Meng et al. (1999) ha valutato l'effetto di 6 differenti D (0,6; 1,2; 1,8; 2,4; 3,6; 4,8) sui parametri di fermentazione e la crescita microbica in un SFCC. Aumentando D hanno ottenuto un incremento del pH del liquido di fermentazione, conseguente alla maggiore quantità di saliva fornita e ad una riduzione di VFA rimossi dal flusso più elevato, un abbassamento delle concentrazioni di NH_3 ed un incremento dell'efficienza microbica (MOEFF).

Eun et al. (2004), valutando l'effetto di 3 D (0,8; 1,5; 3) sui parametri di fermentazione in un SFCC (Teather e Sauer, 1988), riportarono invece che all'aumentare di D, aumenta anche la produzione di NH_3 e CH_4 , ed incrementa il pH, ma non c'è effetto sulla produzione giornaliera totale di VFA.

È chiaro quindi come al variare del sistema di fermentazione anche i parametri misurati possano dare risultati diversi, suggerendo che, essendo D un parametro in grado di influenzare tutto il pattern di fermentazione, debba essere ben calibrato al sistema *in vitro* specifico, in funzione di un adeguato equilibrio dell'ambiente ruminale di fermentazione (pH, crescita microbica, costante rimozione dei prodotti di fermentazione e della DM accumulata, etc.).

2.2.3 Volume e origine dell'inoculo ruminale iniziale

Per i fermentatori in continuo non esiste un vero e proprio protocollo riguardo il volume minimo di inoculo. Confrontando i dati della tabella 1, si nota come su 44 studi in totale, solo 14 (9 RUSITEC, 2 DFCC e 3 SFCC) abbiano un VI inferiore al VF, stando ad indicare che al liquido ruminale di inoculo è stata addizionata della saliva artificiale.

L'aggiunta di saliva all'inoculo iniziale quindi è una pratica poco utilizzata, ma che può rispondere alla necessità dei grandi volumi di liquido ruminale richiesto, permettendo di ridurre le quantità di inoculo. Infatti, se si considera che un sistema di fermentazione in continuo è costituito almeno da 4 vasi di fermentazione, e che in media il volume di inoculo è di 880 ml di liquido ruminale (483,3 ml, RUSITEC; 1226,8 ml, DFCC; 932,3 ml, SFCC), una prova richiederebbe 3520 ml di liquido ruminale filtrato. Volumi così alti limitano la scelta della specie animale donatrice (un ruminante di ovino va dai 3-15 l di volume, mentre uno di bovino da 35-100 l; Dehority, 2003), il numero minimo di animali donatori (prelevare grossi volumi di contenuto ruminale da un animale sottopone il donatore ad uno stress fisiologico) portando la scelta verso un numero maggiore di animali, la scelta della tecnica di prelievo (avere come fonte per l'inoculo animali macellati permette un prelievo di liquido ruminale in quantità maggiori; Mould et al., 2005) e la scelta di integrare l'inoculo ruminale con della saliva artificiale (utilizzando quindi quantità inferiori di liquido ruminale).

Le tecniche di prelievo maggiormente utilizzate per ottenere un inoculo ruminale sono: animali con fistola/cannula ruminale, prelievo tramite sonda esofagea, prelievo da animali in macello. Il prelievo dalla cannula ruminale è considerato il metodo di riferimento per la raccolta di campioni di contenuto ruminale in nutrizione ruminale (Ramos-Morales et al., 2014). Nonostante sia stato verificato come questa tecnica non influenzi negativamente l'ingestione, la performance produttiva e l'anatomia del tratto gastro-intestinale dell'animale donatore (Kristensen et al., 2010), numerosi sono gli studi che la mettono a confronto con la tecnica della sonda esofagea in riferimento all'effetto sul pattern fermentativo e sulla comunità microbica, cercando di delineare punti di forza e debolezze di entrambe le tecniche di prelievo. (Lodge-Ivey et al., 2009; Shen et al., 2012; Ramos-Morales et al., 2014). Nello specifico, si può evidenziare come tramite sonda esofagea non sia possibile prelevare la stessa quantità di contenuto solido ruminale permessa da un prelievo da cannula ruminale e che entrambe le tecniche rendano difficile standardizzare il prelievo in quanto altamente influenzato dal sito di campionamento in sede ruminale. D'altro canto, il prelievo con sonda esofagea viene ancora considerato una valida alternativa alla cannula ruminale in quanto permette di ridurre i costi sperimentali dovuti al mantenimento e alla preparazione di bovini con cannula ruminale, e il liquido ruminale prelevato risulta avere una maggiore biodiversità batterica (Lodge-Ivey et al., 2009; Ramos-Morales et al., 2014).

Un'alternativa al prelievo da cannula ruminale o da sonda esofagea è il prelievo di liquido ruminale da bovini al macello. Questa, grazie al maggior numero di animali disponibili, consente il prelievo di quantità maggiori di liquido ruminale rispetto alle tecniche precedentemente descritte, da diverse classi di donatori (vacche in lattazione, vitelloni, etc.), riduce la variabilità dovuta al singolo animale, ma richiede che il materiale raccolto venga adeguatamente conservato per ridurre al minimo le perdite dell'attività microbica, durante il trasporto dal macello al laboratorio di analisi (Mould et al. 2005).

Qualunque sia il metodo di prelievo, il contenuto ruminale prelevato (solido e liquido) viene di norma filtrato con una garza di nylon (cheescloth) in singolo o multi strato, effettuando il processo in tempi il più brevi possibile per evitare shock termici all'inoculo. L'utilizzo di un filtro con maglia troppo sottile (<250 µm), sebbene permetta di trattenere i residui alimentari presenti nel fluido ruminale, riduce però il numero di protozoi e funghi ruminali inoculati, andando ad alterare la popolazione microbica dell'inoculo.

Il sistema di prelievo è quindi uno delle principali fonti di variabilità dell'inoculo ruminale, assieme alla dieta dell'animale donatore, alla specie animale e al metodo di preparazione dell'inoculo stesso (Mould et al. 2005). Warner (1956) evidenziò l'importanza di utilizzare per il prelievo dell'inoculo dei donatori alimentati con la stessa dieta utilizzata nella prova *in vitro*, ai fini di una maggiore standardizzazione e ripetibilità delle prove. Questo oggi giorno però non è sempre possibile o conveniente, in quanto spesso nelle prove *in vitro* vengono utilizzate delle diete "estreme" non adatte all'animale, o contenenti additivi a dosi elevate, e quindi potenzialmente tossici per l'animale donatore.

2.2.4 Alimentazione dei fermentatori

Nelle prove con i sistemi di fermentazione in continuo, l'alimento può essere somministrato sfarinato (sfuso in sacchetti di nylon messi ad incubare) o in forma di pellet. In genere gli ingredienti che compongono una dieta vengono macinati o tritati (4-10 mm i fieni; 2-4 mm i concentrati; 1-4 mm le miscele; Gizzi et al., 1998; Cardozo et al., 2004; Abel et al., 2006; Carro et al., 2009; Martínez et al., 2009; Molina-Alcaide et al., 2009). Una dimensione piccola delle particelle di alimento è funzionale all'aumento della superficie esposta all'azione di degradazione microbica, in quanto particelle troppo grandi non verrebbero degradate nei tempi brevi tipici delle prove *in vitro*; in più

l'alimento non dovrebbe essere lasciato troppo grossolano in modo da non costituire una fonte di ostruzione per il liquido effluente e per i prelievi, ma d'altro canto la parte di foraggio della dieta macinata troppo fine non permetterebbe la creazione di un capello fibroso tipico dell'ambiente ruminale, e favorevole alla proliferazione dei protozoi.

I sistemi di fermentazione in continuo possono ricevere l'alimento manualmente oppure automaticamente tramite l'ausilio di un dispositivo di alimentazione. Il sistema di Hoover et al. (1976) è dotato di un dispositivo di alimentazione meccanico, particolarmente indicato per la distribuzione dell'alimento in pellet, in grado di razionare la dieta ad intervalli prefissati, per cicli di 24h. Anche nel sistema di Meng et al. (1999) l'alimento in forma di pellet viene introdotto nel vaso di fermentazione da un dispositivo automatico. Nel SFCC di Slyter et al. (1966) ed in quello di Teather e Sauer (1988) l'alimento viene somministrato manualmente attraverso una delle porte situate nel tappo del vaso di fermentazione. Nel RUSITEC l'alimento viene introdotto nel contenitore di fermentazione racchiuso in sacchetti, che vengono sostituiti ogni 48h.

La presenza di un dispositivo automatico di alimentazione rende il design del sistema *in vitro* più complesso, ma riduce il lavoro richiesto ad un operatore, in particolar modo quando la frequenza dell'alimentazione è alta. Il sistema di alimentazione non ha lo stesso impatto sui processi fermentativi come la quantità e la frequenza con cui viene somministrato l'alimento. Calsamiglia et al. (2002), in uno studio sugli effetti delle fluttuazioni di pH sul pattern fermentativo, ha distribuito l'alimentazione giornaliera (100 g DM/d) con un tasso di 0.83g ogni 10 minuti, in modo da non avere un effetto della dieta sul pH. In generale però, i sistemi di fermentazione in continuo ricevono l'alimento dalle 2 alle 4 volte al giorno, con intervallo variabile; Muetzel et al. (2009) giustificarono la somministrazione dell'alimento ad una frequenza bassa (per es. 2 volte al giorno) con un mantenimento della curva di pH il più simile possibile alla situazione ruminale reale.

In base alla meta-analisi effettuata (Tabella 1) la quota di alimento somministrato giornalmente ha un range molto ampio (9-120 g DM/d); questo parametro è dipendente però dal sistema di fermentazione utilizzato (e quindi dal volume di fermentazione e di inoculo). Secondo uno studio di Cantalapiedra-Hijar et al. (2011), non è solo la quantità di alimento o la frequenza di somministrazione dello stesso ad influire sul processo fermentativo, ma soprattutto il rapporto dato tra alimento e buffer introdotto (F/B). Nei sistemi di fermentazione in cui non sussiste un controllo del pH tramite aggiunta di acidi o basi (Calsamiglia et al. 2002) il parametro F/B è quello che determina il range di pH di

fermentazione (Carro et al., 2009). È quindi molto importante secondo gli autori valutare l'effetto di diversi F/B sul pattern fermentativo *in vitro*. In questo studio hanno dimostrato come in un SFCC il F/B, agendo sulla diversità microbica, moduli anche i parametri di fermentazione; nello specifico aumentando il rapporto F/B (da 23,5 a 35 g DM/l) si ha un abbassamento di pH, un aumento degli VFA totali prodotti e una riduzione della digeribilità. Infatti, se la quantità di alimento è troppo alta rispetto al flusso di saliva, c'è un accumulo di materiale all'interno del fermentatore (sostanza secca, prodotti di fermentazione), che risulta essere di impatto negativo sulla popolazione microbica, riducendo la digeribilità microbica, e alterando l'intero equilibrio ruminale.

2.2.5 Articolazione delle prove, disegni sperimentali e rilievi

In genere, un sistema di fermentazione in continuo è costituito da una serie di vasi di fermentazione (di solito 4 o multipli di 4) tali da permettere una serie di repliche per tesi all'interno del periodo di fermentazione (run). Dalla letteratura si apprende come le prove sperimentali sono costituite da almeno 2 run, ognuno dei quali è suddiviso in un periodo di adattamento, necessario alla popolazione microbica ruminale per adattarsi al sistema *in vitro* ed alla nuova dieta, ed in un periodo dedicato al campionamento ed ai rilievi sperimentali, nel quale si ritengono ormai nulli gli effetti del sistema sul liquido di fermentazione, considerandolo influenzato solo dalle tesi sperimentali. Tra i CC, i sistemi RUSITEC permettono run mediamente più lunghi (9,2 d di adattamento e 8,2 d di campionamento) rispetto agli altri sistemi (6 d di adattamento e 2,8 d di campionamento, DFCC; 6,2 d di adattamento e 4,5 d di campionamento, SFCC), in quanto sembra che questa tipologia di rumine artificiale mantenga una più duratura sopravvivenza delle popolazioni microbiche (Crawford et al., 1980; Carro et al., 2009).

I rilievi sperimentali possono essere effettuati sia sul liquido di fermentazione nel fermentatore, sia sul liquido effluente.

In genere, sul liquido di fermentazione vengono effettuati rilievi riguardanti il pattern fermentativo (VFA, NH₃, pH, potenziale di ossido-riduzione, etc.) e studi sulla popolazione microbica (conte di cellule protozoarie, conte di cellule batteriche, estrazione di DNA e RNA e successiva analisi); il liquido effluente invece viene solitamente campionato per studi di bilancio (digeribilità della OM e DM, bilancio dell'N, efficienza microbica, etc.). Alcuni sistemi di fermentazione ruminale, essendo dotati di vasi di

fermentazione a tenuta ermetica, permetto lo studio dei gas prodotti durante la fermentazione (gas totali, CH₄, etc.).

Il grafico 1, basato sulla meta-analisi effettuata, mette in evidenza come l'analisi dei parametri di fermentazione di base (pH, VFA e NH₃) e di bilancio (digeribilità di DM, OM, NDF e bilancio dell'azoto) sia basilare negli studi di fermentazione ruminale, in quanto presente in più del 70% degli studi analizzati, costituendo un indicatore della fermentazione in atto; per contro, i rilievi sperimentali più mirati (produzione di metano e dei gas totali di fermentazione, studio delle comunità microbiche e della loro attività enzimatica) si presentano con meno del 40% degli studi analizzati, in quanto dipendenti dalla tesi sperimentale specifica (per es. analisi del metano prodotto in risposta alla sostituzione di *Dactylis glomerata* con semi di lino nella dieta; Soder et al., 2012).

2.2.6 Confronto tra CC e sistemi “Batch”

Sin dai primi prototipi di ruminanti artificiali si era consapevoli della necessità di mantenere anche *in vitro* l'originale popolazione microbica ruminale, rendendo possibile una tipica attività microbica (Gall e Glaws, 1951). Infatti, un sistema di fermentazione ruminale *in vitro* può essere considerato efficace in base alla capacità di mantenere una popolazione microbica rappresentativa di quella ruminale anche in condizioni sperimentali (Warner, 1956; Slyter e Putnam, 1967).

Soto et al. (2013) hanno valutato questa capacità su 3 diversi sistemi di fermentazione ruminale *in vitro*: il Daisy^{II} (ANKOM), una “batch culture” (Goering e van Soest, 1970) e un SFCC (Miettinen e Setälä, 1989). I tre sistemi sono stati inoculati con lo stesso liquido ruminale, alimentati con la stessa razione, hanno avuto come oggetto di studio gli stessi gruppi microbici (batteri, archea, funghi e protozoi), mantenendo quindi il più possibile una standardizzazione sperimentale tra i sistemi. Dai risultati si rileva come nel Daisy tutti i gruppi microbici sono scomparsi dopo 48h di incubazione, ad eccezione dei metanogenici; nella “batch culture” si è riscontrato invece un aumento dei batteri fibrolitici nelle prime 24h, ma dopo 72h una drastica diminuzione di tutti i gruppi microbici (con una media prevalenza dei metanogenici); nel SFCC, dopo 4 giorni di incubazione, mentre la popolazione batterica ha mantenuto concentrazioni stabili, i microrganismi metanogenici e i protozoi hanno subito una diminuzione di numero (è noto come nei CC risulta difficile la sopravvivenza di tutte le famiglie protozoarie dopo i primi giorni di incubazione; Moumen et al., 2009). Per quanto riguarda l'aspetto qualitativo

della popolazione microbica, la diversità batterica è diminuita nel Daisy e nella batch culture dopo 48 e 24 h di incubazione, rispettivamente; al contrario, nel SFCC dopo 4 giorni di incubazione, il liquido di fermentazione aveva una diversità della comunità batterica paragonabile a quella dell'inoculo, questo grazie alla continua infusione di alimento e rimozione dei prodotti di fermentazione che permettono il mantenimento di un ambiente ruminale adatto alla sopravvivenza microbica. Gli autori concludono che i SFCC (o in generale i sistemi di fermentazione in continuo) sono in grado di mantenere un'abbondanza microbica e una diversità della comunità batterica simili a quelle tipiche dell'ambiente ruminale. Come appurato anche da questo studio, mentre la popolazione batterica sopravvive facilmente nei sistemi di fermentazione in continuo, la sopravvivenza della popolazione protozoaria è molto più difficile. Secondo Coleman (1980) ci sono diverse ragioni per le quali i protozoi difficilmente sopravvivono in un sistema in continuo, tra le quali la difficoltà di nutrirsi se il liquido di fermentazione è continuamente agitato, l'accumulo dei prodotti di fermentazione (risultando poi tossico), la mancanza di nicchie o "punti morti" all'interno del fermentatore nei quali potersi riparare.

Diversi autori hanno apportato delle modifiche (strutturali o d'impostazione) dei CC al fine di migliorare la sopravvivenza di questo gruppo microbico:

- Abe e Kurihara (1984), inserirono del materiale spugnoso all'interno del vaso di fermentazione del loro CC (Nakamura e Kurihara, 1978); il materiale spugnoso fungendo da protezione e creando delle nicchie nelle quali i protozoi potessero ripararsi, permise così una sopravvivenza di *Diplodinium* spp., *Epidinium* spp., *Dasytricha ruminantium* and *Entodinium* spp. per 3 settimane.
- Miettinen e Setälä (1989), adottando un sistema di agitazione non vigoroso e intermittente, e mantenendo il pH sopra il 6, ottennero concentrazioni di protozoi ($2,5 \times 10^4$) a fine prova paragonabili a quelle del DFCC di Hoover et al. (1976).
- Muetzel et al. (2009) ottennero una soddisfacente sopravvivenza dei protozoi ($1,5 \times 10^5$) per i primi 6 giorni della prova (periodo di adattamento), secondo gli autori grazie alla formazione del cappello fibroso sulla superficie del liquido di fermentazione (permesso dal nuovo design del fermentatore), che fungeva quindi da nicchia ambientale e di protezione per i protozoi.

2.2.7 Confronto con la sperimentazione *in vivo*

I sistemi di fermentazione in continuo, grazie alla loro capacità di simulare l'ambiente ruminale e mantenere la popolazione microbica tipica del rumine, sono dei validi strumenti per lo studio delle dinamiche delle popolazioni microbiche e dei processi fermentativi. I CC presentano infatti una serie di vantaggi in rapporto alle prove *in vivo*: la capacità di valutare un elevato numero di trattamenti in sufficienti repliche ed in periodi brevi; la capacità di valutare alimenti e additivi in quantità elevate che in alcuni casi potrebbero essere tossiche all'animale, e quindi non utilizzabili in una prova *in vivo*; costi di sperimentazione più bassi rispetto alle prove *in vivo* (Hristov et al., 2012).

L'utilizzo di prove sperimentali con tecniche *in vitro* richiede che i risultati ottenuti siano comparabili e rapportabili alla situazione *in vivo*; con questa finalità alcuni autori hanno confrontato i dati di prove sperimentali parallele *in vitro* ed *in vivo* (Bhatta et al., 2007; Carro et al., 2009). In particolare una meta-analisi (Hristov et al., 2012) ha messo a confronto i parametri di fermentazione ruminale, la popolazione microbica e la digeribilità degli alimenti di prove effettuate con dei sistemi di fermentazione in continuo (separati in Rusitec e non-Rusitec) e prove *in vivo* (tabella 4). La meta-analisi in questione ha dimostrato che i CC in genere hanno valori più bassi di AGV totali, concentrazioni minori di acetato, ridotta popolazione protozoaria e minor digeribilità della OM e di NDF. In linea generale, gli autori evidenziano una variabilità maggiore nel dataset dei CC rispetto alle prove *in vivo*, attribuibile in parte alla variabilità di design dei diversi sistemi utilizzati, alla variabilità dell'inoculo (dovuta alla necessità di prelevare il liquido ruminale, condizione non necessaria nelle prove *in vivo*) e probabilmente ai trattamenti utilizzati in condizioni estreme non attuabili in condizioni *in vivo*.

Si può ritenere l'uso dei sistemi di fermentazione *in vitro* un'ottima alternativa alla sperimentazione *in vivo*, tenendo però presente che i risultati devono essere contestualizzati al sistema *in vitro* utilizzato, e ai limiti impliciti alle condizioni *in vitro* (il sistema non riproduce l'intero apparato digerente, il materiale di costruzione non riproduce l'interazione che c'è tra animale e ambiente ruminale, etc.).

2.3 Obiettivi

Il presente progetto di tesi si è basato sui seguenti obiettivi:

- a. Progettare e realizzare un sistema di fermentazione ruminale in continuo, sulla base dei modelli presenti in letteratura, caratterizzato dall'aver una semplicità di design e assemblaggio, componenti economiche e facilmente reperibili.
- b. Effettuare delle prove di settaggio e calibrazione al fine di individuare le impostazioni e condizioni di incubazione adatte al sistema, in modo da conservare la popolazione microbica e l'ambiente ruminale per esperimenti di lungo termine.
- c. Eseguire prove sperimentali con il sistema di fermentazione in continuo:
 - Valutare l'effetto di urea a rilascio controllato sui parametri di fermentazione e l'efficienza microbica;
 - Valutare l'effetto della somministrazione di lievito a diverse dosi sui parametri di fermentazione e sulle popolazioni microbiche (protozoi, batteri).

Tabella 1. Impostazioni e rilievi effettuati in prove sperimentali con sistemi di fermentazione ruminale in continuo¹.

<i>Authors</i>	<i>Year</i>	<i>System</i> ²	<i>VF</i> (ml)	<i>VI</i> (ml)	<i>F</i> (g/d)	<i>B</i> (ml/d)	<i>D</i>	<i>F/B</i> (g/l)	<i>Duration</i>	<i>Data collection</i> ³
Meng et al.	2000	SFCC	1460	1460	31	1051	0,72	29,5	5+3	pH; VFA; NH ₃ ; DM; OM; Starch; CP dig; N-flow; microbial community structure.
			1460	1460	31	2102	1,44	14,7	5+3	pH; VFA; NH ₃ ; DM; OM, Starch; CP dig; N-flow; microbial community structure.
Devant et al.	2001	DFCC	1320	1320	100	3168	2,40	31,6	5+2	VFA; NH ₃ ; DM, OM & NDF dig; N- flow; N-fractions.
Calsamiglia et al.	2002	DFCC	1320	1320	100	3168	2,40	31,6	5+3	VFA; NH ₃ ; DM, OM, NDF & ADF dig; N-flow; N-fractions.
Miller-Webster et al.	2002	DFCC	1164	1164	100	3630	3,12	27,5	6+3	pH; VFA; NH ₃ ; DM, OM, NDF, ADF, NSC & CP dig; N-flow.
Griswold et al.	2003	DFCC	1654	1400	100	4763	2,88	21,0	7+3	VFA; NH ₃ ; DM, OM, CP, NDF, ADF, NFC & NSC dig; N-flow; N- fractions.
Cardozo et al.	2004	DFCC	1320	1320	95	3168	2,40	30,0	8+2	VFA; NH ₃ ; DM, OM, NDF & ADF dig; N-flow; N-fractions.
Eun et al.	2004	SFCC	700	700	13	560	0,80	23,2	6+7	pH; VFA; NH ₃ ; Methane; DM, OM & NDF dig; N-flow; Energy balance.
			700	700	13	1050	1,50	12,4	6+7	pH; VFA; NH ₃ ; Methane; DM, OM & NDF dig; N-flow; Energy balance.
			700	700	13	2100	3,00	6,2	6+7	pH; VFA; NH ₃ ; Methane; DM, OM & NDF dig; N-flow; Energy balance.
Busquet et al.	2005	DFCC	1320	1320	95	3168	2,40	30,0	6+3	VFA; NH ₃ ; DM, OM, NDF & ADF dig; N flow; N-fractions.
Oeztuerk et al.	2005	RUSITEC	750	750	9	750	1,00	12,0	8+8	pH; redox potential; VFA; NH ₃ ; N- flow.
Abel et al.	2006	RUSITEC	1000	750	12	490	0,49	24,5	10+5	pH; VFA; NH ₃ ; Methane; Microbial community structure.

Castillejos et al.	2006	DFCC	1320	1320	95	3168	2,40	30,0	6+3	VFA; NH ₃ ; DM, OM, NDF & ADF dig; N- flow; N-fractions.
Dann et al.	2006	DFCC	1164	1164	100	3630	3,12	27,5	6+3	pH; VFA; NH ₃ ; DM, OM, NDF, ADF, NSC & CP dig; N-flow; microbial activity.
Martín García et al.	2006	SFCC	700	700	22,2	672	0,96	33,0	7+4	pH; VFA; NH ₃ ; N- flows.
Sniffen	2006	DFCC	1164	1164	100	3630	3,12	27,5	6+3	pH; VFA; lactic acid; NH ₃ ; DM, OM, NDF, ADF, NSC & CP dig; N- flow; microbial activity.
Bach et al.	2008	DFCC	1030	1030	75	2472	2,40	30,3	6+3	pH; VFA; NH ₃ ; OM, NDF, NFC & CP dig; N- flow.
Cerrato-Sánchez et al.	2008	DFCC	1320	1320	97	3168	2,40	30,6	5+3	VFA; NH ₃ ; OM, CP & NDF dig; N flow; N- fractions.
Carro et al.	2009	RUSITEC	500	300	15,6	600	1,20	26,0	8+6	pH; VFA; NH ₃ ; DM, NDF dig; microbial activity; N-flow
		SFCC	700	700	27	850	1,21	31,8	8+6	pH; VFA; NH ₃ ; DM, NDF dig; microbial activity; N-flow.
Martínez et al.	2009	RUSITEC	450	250	30	545	1,21	55,0	10+6	pH; VFA; NH ₃ ; Methane; DM, NDF & ADF dig; microbial activity; N- flow;
			450	250	30	780	1,73	38,5	10+6	pH; VFA; NH ₃ ; Methane; DM, NDF & ADF dig; microbial activity; N- flow.
Molina-Alcaide et al.	2009	SFCC	700	700	75	960	1,37	78,1	7+4	pH; VFA; NH ₃ ; OM dig; microbial activity; N-flow.
Muetzel et al.	2009	SFCC	850	250	10	1000	1,18	10,0	6+10	pH; VFA; NH ₃ ; DM dig; microbial community structure; microbial activity.
Oetzuerk	2009	RUSITEC	750	750	9	750	1,00	12,0	8+8	pH; VFA; NH ₃ ; OM dig.
Yang et al.	2009	DFCC	1200	1000	57	2880	2,40	19,8	6+2	pH; VFA; NH ₃ ; OM, NDF, Starch, CP dig; N-flow.

García-González et al.	2010	RUSITEC	600	350	16	600	1,00	26,7	7+12	pH; VFA; NH ₃ ; Methane; DM, NDF dig; N-flow; gas production.
Martínez et al.	2010	RUSITEC	450	250	30	740	1,64	40,5	10+6	pH; VFA; lactic acid; NH ₃ ; DM, NDF & ADF dig; microbial activity; N- flow.
Martínez et al.	2010	RUSITEC	450	250	30	740	1,64	40,5	10+7	Microbial community structure.
Cantalapiedra-Hijar et al.	2011	SFCC	1000	700	30	1272	1,27	23,5	7+5	pH; VFA; NH ₃ ; DM, OM, NDF, ADF, NFC dig; N-flow; microbial community structure.
			1000	700	44	1272	1,27	35,0	7+5	pH; VFA; NH ₃ ; DM, OM, NDF, ADF, NFC dig; N-flow; microbial community structure.
Fuentes et al.	2011	DFCC	1320	1320	100	3168	2,40	31,6	4+3	VFA; NH ₃ ; FA; OM, CP & NDF dig; N- flow; N-fractions; Lipolysis; microbial community structure.
King et al.	2011	SFCC	700	700	20	1728	2,47	11,6	8+3	pH; VFA; NH ₃ ; FA; Methane; DM, OM & NDF dig; N-flow.
Lee et al.	2011	RUSITEC	700	500	10	720	1,03	13,9	9+3	pH; VFA; NH ₃ ; Methane; Gas production; DM, OM, ADF, NDF, WSC & N- dig; Lipolysis.
Williams	2011	SFCC	700	700	20	2600	3,71	7,7	6+3	pH; VFA; NH ₃ ; Methane; DM, OM & NDF dig; N-flow.
Brooks et al.	2012	SFCC	1460	1460	50	2100	1,44	23,8	4+3	pH; VFA; NH ₃ ; OM dig; N flow.
Narvaez et al.	2012	RUSITEC	900	900	10	626	0,70	16,0	9+10	VFA; NH ₃ ; Methane; gas production; DM & NDF dig; microbial community structure.
Ramos and Kerley	2012	SFCC	1460	1460	50	2100	1,44	23,8	5+3	pH; VFA; NH ₃ ; DM, OM, CP, NDF & ADF dig; N flow.
Soder et al.	2012	DFCC	1120	1120	70	2957	2,64	23,7	7+3	pH; VFA; NH ₃ ; Methane; DM, OM & NDF dig; N-flow.
Soder et al.	2013	DFCC	1120	1120	70	2957	2,64	23,7	7+3	pH; VFA; NH ₃ ; Methane; DM, OM, NDF & CP dig; N-flow.

AbuGhazaleh et al.	2014	SFCC	1700	1300	120	4080	2,40	29,4	8+1	pH; VFA; FA; microbial community structure.
Brooks et al.	2014	SFCC	1460	1460	50	2100	1,44	23,8	5+3	pH; VFA; Lactate; NH ₃ ; DM & OM dig; N-flow.
Li et al.	2014	RUSITEC	1800	500	30	1296	0,72	23,1	12+21	pH; VFA; NH ₃ ; Methane; gas production; DM dig; microbial community structure.

¹Da 39 pubblicazioni, 45 prove in tutto.

²RUSITEC (Czerkawski e Breckenridge, 1977); SFCC (Single Flow Continuous Culture); DFCC (Dual Flow Continuous Culture).

³Microbial community structure: comprende le tecniche di biologia molecolare (real time-PCR, T-RLFP, DGGE, ARISA) e le conte batteriche e protozoarie; Microbial activity: attività microbica valutata in base agli enzimi batterici.

Grafico 1. Frequenza relativa dei rilievi sperimentali sul totale degli studi inclusi nella meta-analisi sui sistemi di fermentazione ruminale in continuo.

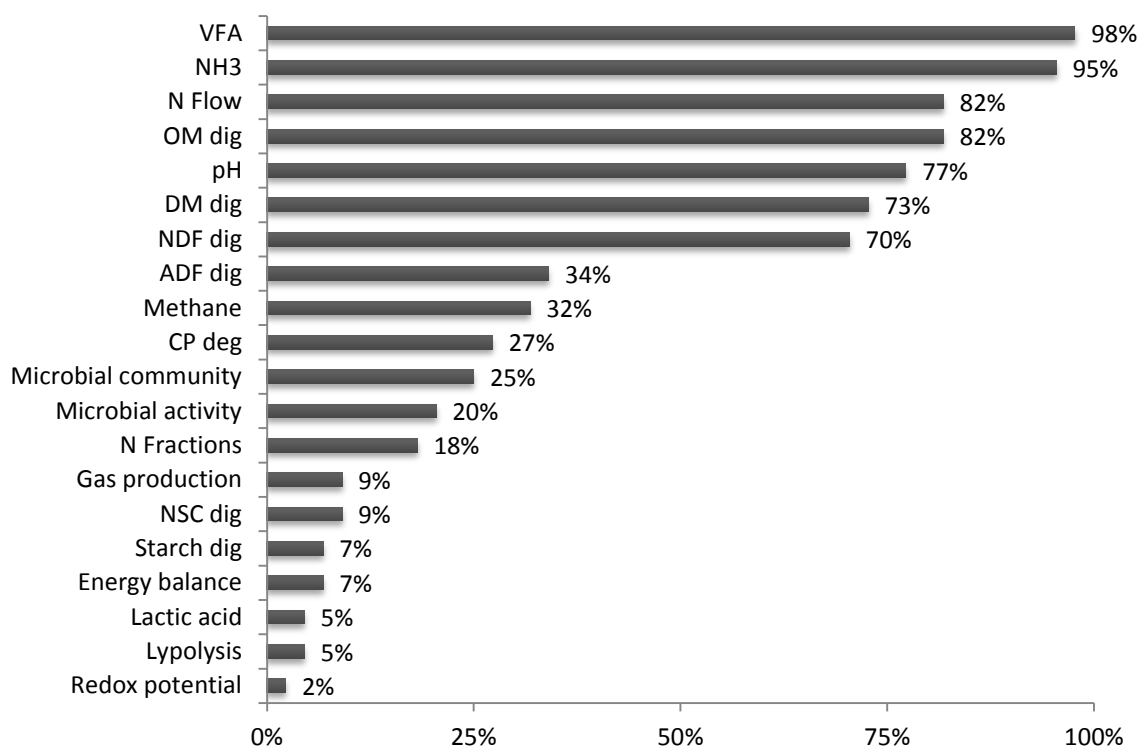


Tabella 2. Output della meta-analisi effettuata su studi sperimentali con sistemi di fermentazione ruminale in continuo.

	RUSITEC	DV*	DFCC	DV	SFCC	DV
item	12		15		17	
VF (ml)	733.3	385.14	1257.0	147.27	1026.0	377.37
VI (ml)	483.3	244.33	1226.8	124.10	932.3	397.86
F (g/d)	13.3	9.70	90.3	14.48	36.4	27.79
B (ml/d)	719.7	204.30	3273.0	512.37	1623.3	884.01
D	1.1	0.40	2.6	0.30	1.6	0.80
F/B (g/l)	27.4	13.65	27.8	3.93	24.6	16.59
Duration of the trial (d)						
Adaptation	9.2	1.36	6.0	1.00	6.2	1.20
Measurement	8.2	4.67	2.80	0.41	4.5	2.24

*DV: deviazione standard

Tabella 3. Soluzioni tampone maggiormente utilizzate nei sistemi di fermentazione ruminale in continuo.

	McDougall, 1948.	Slyter, L. L. et al., 1966.	Weller e Pilgrim, 1974.
Reagente, g/L			
NaHCO ₃	9,80	3,83	5,00
NaH ₂ PO ₄	-	5,60	-
Na ₂ HPO ₄ anhyd	2,44	-	1,75
KHCO ₃	-	-	1,60
NaCl	0,47	0,28	
KCl	0,57	0,36	0,60
CaCl ₂ anhyd	0,04	0,02	-
MgSO ₄ anhyd	0,06	-	-
MgCl ₂ anhyd	-	0,04	-
Urea	-	0,20	0,20

Tabella 4. Statistica descrittiva delle banche dati degli esperimenti con sistemi di fermentazioni in continuo e sperimentazione *in vivo* usati nella meta-analisi¹ (Hristov et al., 2012)

Variable	n	Mean	SD	CV
RUSITEC continuous culture				
Liquid dilution rate, ² h ⁻¹	160	0.03	0.01	33.9
pH	288	6.84	0.25	3.7
Ammonia, mM	155	9.0	5.1	55.9
VFA concentration, mM				
Total	250	78.9	30.9	39.1
Acetate	211	43.9	18.1	41.3
Propionate	211	18.0	8.1	44.7
Butyrate	207	11.4	7.3	63.7
Isobutyrate	132	0.5	0.3	48.9
Valerate	143	3.6	2.4	68.8
Isovalerate	119	1.8	0.8	43.1
Acetate:propionate	251	2.7	1.0	35.7
Bacteria, ³ × 10 ⁹ /mL	150	36.0	146.1	405.8
Protozoa, × 10 ³ /mL	163	7.8	10.1	129.7
MPS, ⁴ g of N/kg of OM	71	24.7	8.9	35.9
Apparent digestibility, %				
DM	226	55.9	14.1	25.2
OM	177	52.2	13.9	26.7
CP	126	63.1	17.9	28.3
NDF	203	34.2	15.9	46.4
ADF	140	29.2	14.3	49.1
NSC	20	87.7	4.5	5.1
Non-RUSITEC continuous culture				
Liquid dilution rate, h ⁻¹	566	0.09	0.05	58.1
Solid dilution rate, h ⁻¹	309	0.05	0.01	19.6
pH	388	6.25	0.49	7.9
Ammonia, mM	469	7.8	6.5	83.5
VFA concentration, mM				
Total	425	93.8	36.3	38.7
Acetate	411	54.5	22.6	41.5
Propionate	412	23.6	13.8	58.4
Butyrate	412	11.3	6.2	54.3
Isobutyrate	280	0.8	1.1	136.8
Valerate	331	2.4	1.5	61.0
Isovalerate	274	1.6	1.7	107.2
Acetate:propionate	481	2.6	1.1	41.7
Bacteria, ³ × 10 ⁹ /mL	37	64.2	60.1	93.6
Protozoa, × 10 ³ /mL	61	121.6	176.3	145.0
MPS, ⁵ g of N/kg of OM	180	27.0	15.9	59.1
Apparent digestibility, %				
DM	210	51.1	15.5	30.3
OM	246	44.4	12.7	28.7
CP	314	61.8	37.6	60.8
NDF	308	45.5	17.2	37.7
ADF	245	45.3	17.7	39.0
NSC	203	80.2	10.9	13.6
In vivo data⁶				
pH	353	6.13	0.28	4.5
Ammonia, mM	366	7.6	3.2	42.5
VFA concentration, mM				
Total	366	116.9	19.8	26.3
Acetate	366	72.1	12.8	17.8
Propionate	366	26.0	7.2	27.7
Butyrate	366	13.2	3.7	27.7
Isobutyrate	366	1.0	0.3	27.7
Valerate	366	2.2	0.8	36.4
Isovalerate	366	1.7	0.5	30.0
Acetate:propionate	366	2.9	0.8	26.0
Total-tract apparent digestibility, %				
DM	245	67.5	6.0	8.9
OM	352	69.6	6.2	8.9

Table 1 (Continued). Descriptive statistics of the continuous-culture and in vivo data sets used in the meta-analysis¹

Variable	n	Mean	SD	CV
CP	351	65.6	10.5	16.1
NDF	352	53.0	11.6	21.9

¹From 180 references. Studies in the continuous-culture data set were classified into 2 categories: studies that used rumen simulation techniques (RUSITEC; Czerkawski and Breckenridge, 1977) and studies that used other continuous-culture system designs (non-RUSITEC).

²For the RUSITEC data, liquid dilution rate in most cases reported as dilution rate in the original publications.

³In most studies, represents fluid-associated bacteria.

⁴Microbial protein synthesis [g of N/kg of OM digested for RUSITEC (only 1 study, 4 treatment means, re-ported MPS as g of N/kg of OM truly digested).

⁵Microbial protein synthesis, reported as g of N/kg of OM truly digested.

⁶Data set from in vivo trials with lactating dairy cows (Hristov et al., 2001b, 2004a,b, 2005, 2008, 2009, 2010, 2011a,b,c; Hristov and Ropp, 2003; Foley et al., 2006; Vander Pol et al., 2008; Oelker et al., 2009; Agle et al., 2010a,b; Lee et al., 2011; Mathew et al., 2011; Tekippe et al., 2011; Reveneau et al., 2012a,b).

2.4 Bibliografia

Aafjes, J.H., Nijhof, J.K., 1967. A simple artificial rumen giving good production of volatile fatty acids. *Brit. Vet. J.* 123, 436–446.

Abel, H., Schröder, B., Lebzien, P., Flachowsky, G., 2006. Effects of defaunation on fermentation characteristics and biotin balance in an artificial rumen-simulation system (RUSITEC) receiving diets with different amounts and types of cereal. *Brit. J. Nutr.* 95, 99-104.

Abe, M., Kumeno, F., 1973. *In vitro* simulation of rumen fermentation: apparatus and effects of dilution rate and continuous dialysis on fermentation and protozoal population. *J. Anim. Sci.* 36, 941–948.

Abe, M., Kurihara, Y., 1984. Long-term cultivation of certain rumen protozoa in a continuous fermentation system supplemented with sponge materials. *J. Appl. Bacteriol.* 56, 201–213.

AbuGhazaleh, A.A., Ishlak, A., 2014. Effects of incremental amounts of fish oil on *trans* fatty acids and *Butyrivibrio* bacteria in continuous culture fermenters. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* 98, 271–278.

Adler, J.H., Dye, J.A., Boggs, D.E., Williams, H.H., 1958. Growth of rumen microorganisms in an *in vitro* continuous-flow system on a protein-free diet. *Cornell Vet.* 48, 53-66.

Bach, A., Ruiz Moreno, M., Thrune, M., Stern, M.D., 2008. Evaluation of the fermentation dynamics of soluble crude protein from three protein sources in continuous culture fermenters. *J. Anim. Sci.* 86, 1364–1371.

Bhatta, R., Tajima, K., Takusari, N., Higuchi, K., Enishi, O., Kurihara, M., 2007. Comparison of *in vivo* and *in vitro* techniques for methane production from ruminant diets. *Asian Australas. J. Anim. Sci.* 20, 1049-1056.

Brooks, M.A., Harvey, R.M., Johnson, N.F., Kerley, M.S., 2012. Rumen degradable protein supply affects microbial efficiency in continuous culture and growth in steers. *J. Anim. Sci.* 90, 4985–4994.

Brooks, M.A., Harvey, R.M., Johnson, N.F., Koutsos, E.A., Kerley, M.S., 2014. Effect of varying dietary starch and fiber levels and inoculum source (mule deer vs. dairy cow) on simulated rumen fermentation characteristics. *Zoo Biol.* 33, 110–120.

Burroughs, W., Headley, H.G., Bethke, R.M., Gerlaugh, P., 1950. Cellulose digestion in good and poor quality roughages using an artificial rumen. *J. Anim. Sci.* 9, 513–522.

Busquet, M., Calsamiglia, S., Ferret, A., Cardozo, P.W., Kamel, C., 2005. Effects of cinnamaldehyde and garlic oil on rumen microbial fermentation in a dual flow continuous culture. *J. Dairy Sci.* 88, 2508–2516.

Calsamiglia, S., Ferret, A., Devant, M., 2002. Effects of pH and pH fluctuations on microbial fermentation and nutrient flow from a dual-flow continuous culture system. *J. Dairy Sci.* 85, 574–579.

Cantalapiedra-Hijar, G., Yáñez-Ruiz, D.R., Newbold, C.J., Molina-Alcaide, E., 2011. The effect of the feed-to-buffer ratio on bacterial diversity and ruminal fermentation in single-flow continuous-culture fermenters. *J. Dairy Sci.* 94, 1374–1384

Cardozo, P.W., Calsamiglia, S., Ferret, A., Kamel, C., 2004. Effects of natural plant extracts on ruminal protein degradation and fermentation profiles in continuous culture. *J. Anim. Sci.* 82, 3230–3236.

Carro, M.D., Ranilla, M.J., Martín-García, A.I., Molina-Alcaide, E., 2009. Comparison of microbial fermentation of high- and low-forage diets in Rusitec, single-flow continuous-culture fermenters and sheep rumen. *Animal* 3, 527-534.

Castillejos, L., Calsamiglia, S., Ferret, A., 2006. Effect of essential oil active compounds on rumen microbial fermentation and nutrient flow in *in vitro* systems. *J. Dairy. Sci.* 89, 2649–2658.

Cerrato-Sanchez, M., Calsamiglia, S., Ferret, A., 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.

Coleman, G.S., 1980. Rumen ciliate protozoa. In: *Advances in Parasitology*. Lumsden W.H.R., Muller R., Baker J.R., Sydney, pp. 121–173.

Czerkawski, J.W., 1976. The artificial rumen. *Laboratory Practice* 25, 15–20.

Czerkawski, J.W., Breckenridge, G., 1977. Design and development of a long-term rumen simulation technique (Rusitec). *Brit. J. Nutr.* 38, 371–384.

Dann, H.M., Ballard, C.S., Grant, R.J., Cotanch, K.W., Carter, M.P., Suekawa, M., 2006. Effects of glutamate on microbial efficiency and metabolism in continuous culture of ruminal contents and on performance of mid-lactation dairy cows. *Anim. Feed Sci. Tech.* 130, 204–224.

Dehority, B.A., 2003. *Rumen microbiology*. Nottingham University Press, Thrumpton, Nottingham.

Devant, M., Ferret, A., Calsamiglia, S., Casals, R., Gasa, J., 2001. Effect of nitrogen source in high-concentrate, low-protein beef cattle diets on microbial fermentation studied *in vivo* and *in vitro*. *J. Anim. Sci.* 79, 1944–1953.

Eun, J.-S., Fellner, V., Gumpertz, M.L., 2004. Methane production by mixed ruminal cultures incubated in dual-flow fermentors. *J. Dairy. Sci.* 87, 112–121.

Fuentes, M.C., Calsamiglia, S., Fievez, V., Blanch, M., Mercadal, D., 2011. Effect of pH on ruminal fermentation and biohydrogenation of diets rich in omega-3 or omega-6 fatty acids in continuous culture of ruminal fluid. *Anim. Feed Sci. Tech.* 169, 35–45.

Gall, L.S., Glaws, W.L., 1951. The Bacteriology of the Artificial Rumen (Abs.). *Bacteriol. Proc.* 1951, 20–21.

García-González, R., González, J.S., López, S., 2010. Decrease of ruminal methane production in Rusitec fermenters through the addition of plant material from rhubarb (*Rheum* spp.) and alder buckthorn (*Frangula alnus*). *J. Dairy. Sci.* 93, 3755–3763.

Gizzi, G., Zanchi, R., Sciaraffia, F., 1998. Comparison of microbiological and fermentation parameters obtained with an improved rumen *in vitro* technique with those obtained *in vivo*. *Anim. Feed Sci. Tech.* 73, 291–305.

Goering, M.K., van Soest, P.J., 1970. Forage fiber analyses (apparatus, reagents, procedures, and some applications). In: *Agr. Handbook*. USDA-ARS, Washington, DC.

Gray, F.V., Pilgrim, A.F., Weller, R.A., 1951. Fermentation in the rumen of the sheep I. the production of volatile fatty acids and methane during the fermentation of wheaten hay and lucerne hay *in vitro* by micro-organisms from the rumen. *J. Exp. Biol.* 28, 74–82.

Griswold, K.E., Apgar, G.A., Bouton, J., Firkins, J.L., 2003. Effects of urea infusion and ruminal degradable protein concentration on microbial growth, digestibility, and fermentation in continuous culture. *J. Anim. Sci.* 81, 329–336.

Hannah, S.M., Stern, M.D., Ehle, F.R., 1986. Evaluation of a dual flow continuous culture system for estimating bacterial fermentation *in vivo* of mixed diets containing various soya bean products. *Anim. Feed Sci. Tech.* 16, 51–62.

Hoover, W.H., Crooker, B.A., Sniffen, C.J., 1976. Effects of differential solid-liquid removal rates on protozoa numbers in continuous cultures of rumen contents. *J. Anim. Sci.* 43, 528–534.

Hristov, A.N., Lee, C., Hristova, R., Huhtanen, P., Firkins, J.L., 2012. A meta-analysis of variability in continuous-culture ruminal fermentation and digestibility data. *J. Dairy. Sci.* 95, 5299–5307.

Huhtanen, C.N., Gall, L.S., 1952. The miniature artificial rumen and its uses. *J. Anim. Sci.* 11, 766.

King, C.C., Dschaak, C.M., Eun, J.-S., Fellner, V., Young, A.J., 2011. Quantitative analysis of microbial fermentation under normal or high ruminal temperature in continuous cultures. *Prof. Anim. Sci.* 27, 319–327.

Kristensen, N.B., Engbæk, M., Vestergaard, M., Harmon, D.L., 2010. Technical note: Ruminal cannulation technique in young Holstein calves: Effects of cannulation on feed intake, body weight gain, and ruminal development at six weeks of age. *J. Dairy. Sci.* 93, 737–742.

Lee, M.R.F., Cabiddu, A., Hou, F., Niderkorn, V., Kim, E.J., Fychan, R., Scollan, N.D., 2011. *In vitro* rumen simulated (RUSITEC) metabolism of freshly cut or wilted grasses with contrasting polyphenol oxidase activities: RUSITEC metabolism of PPO grasses. *Grass Forage Sci.* 66, 196–205.

Li, X., Durmic, Z., Liu, S., McSweeney, C.S., Vercoe, P.E., 2014. *Eremophila glabra* reduces methane production and methanogen populations when fermented in a Rusitec. *Anaerobe* 29, 100–107.

Lodge-Ivey, S.L., Browne-Silva, J., Horvath, M.B., 2009. Technical note: Bacterial diversity and fermentation end products in rumen fluid samples collected via oral lavage or rumen cannula. *J. Anim. Sci.* 87, 2333–2337.

Louw, J.G., Williams, H.H., Maynard, L.A., 1949. A new method for the study *in vitro* of rumen digestion. *Science* 110, 478–480.

- Marston, H.R., 1948. The fermentation of cellulose *in vitro* by organisms from the rumen of sheep. *Biochem. J.* 42, 564-574.
- Martínez, M.E., Ranilla, M.J., Ramos, S., Tejido, M.L., Carro, M.D., 2009. Effects of dilution rate and retention time of concentrate on efficiency of microbial growth, methane production, and ruminal fermentation in Rusitec fermenters. *J. Dairy Sci.* 92, 3930–3938.
- Martínez, M.E., Ranilla, M.J., Tejido, M.L., Ramos, S., Carro, M.D., 2010a. Comparison of fermentation of diets of variable composition and microbial populations in the rumen of sheep and Rusitec fermenters. I. Digestibility, fermentation parameters, and microbial growth. *J. Dairy Sci.* 93, 3684–3698.
- Martínez, M.E., Ranilla, M.J., Tejido, M.L., Saro, C., Carro, M.D., 2010b. Comparison of fermentation of diets of variable composition and microbial populations in the rumen of sheep and Rusitec fermenters. II. Protozoa population and diversity of bacterial communities. *J. Dairy Sci.* 93, 3699–3712.
- Martín García, I., Yáñez Ruiz, D., Moumen, A., Molina Alcaide, E., 2006. Effect of polyethylene glycol, urea and sunflower meal on olive (*Olea europaea* var. *europaea*) leaf fermentation in continuous fermentors. *Small Ruminant Res.* 61, 53–61.
- McDougall, E.I., 1948. Studies on ruminant saliva. 1. The composition and output of sheep's saliva. *Biochem. J.* 43, 99.
- McNaught, M.L., 1951. A qualitative and quantitative study of the breakdown of carbohydrate which accompanies protein formation in bovine rumen contents during *in vitro* incubation. *Biochem. J.* 49, 325–332.
- Meng, Q., Kerley, M.S., Ludden, P.A., Belyea, R.L., 1999. Fermentation substrate and dilution rate interact to affect microbial growth and efficiency. *J. Anim. Sci.* 77, 206–214.

Meng, Q.X., Xia, Z.G., Kerley, M.S., 2000. The requirement of ruminal degradable protein for non-structural carbohydrate-fermenting microbes and its reaction with dilution rate in continuous culture. *Asian Australas. J. Anim. Sci.* 13, 1399–1406.

Menke K.H., Steingass H., 1988. Estimation of the energetic feed value obtained from chemical analysis and *in vitro* gas production using rumen fluid. *Anim. Res. Dev.* 18, 7-55.

Miettinen, H., Setälä, J., 1989. Design and development of a continuous culture system for studying rumen fermentation. *J. Agr. Sci. Finland.* 61, 463–473.

Miller-Webster, T., Hoover, W.H., Holt, M., Nocek, J.E., 2002. Influence of yeast culture on ruminal microbial metabolism in continuous culture. *J. Dairy Sci.* 85, 2009–2014.

Minson, M.K., 1998. A history of *in vitro* techniques., in: *In Vitro Techniques for Measuring Nutrient Supply to Ruminants.*, Occasional Publication-British Society of Animal Science. Deaville, E.R., Owen, E., Adesogan, A.T., Rymer, C., Huntington, J.A. and Lawrence, T.L.J., Edinburgh, pp. 13–19.

Molina-Alcaide, E., Pascual, M.R., Cantalapiedra-Hijar, G., Morales-Garcia, E.Y., Martin-Garcia, A.I., 2009. Effects of concentrate replacement by feed blocks on ruminal fermentation and microbial growth in goats and single-flow continuous-culture fermenters. *J. Anim. Sci.* 87, 1321–1333.

Mould, F.L., Kliem, K.E., Morgan, R., Mauricio, R.M., 2005. *In vitro* microbial inoculum: A review of its function and properties. *Anim. Feed Sci. Tech.* 123-124, 31–50.

Moumen, A., Yáñez-Ruiz, D.R., Carro, M.D., Molina-Alcaide, E., 2009. Protozoa evolution in single-flow continuous culture and Rusitec fermenters fed high-forage diets. *Options Méditerranéenes* 85, 303–308.

- Muetzel, S., Lawrence, P., Hoffmann, E.M., Becker, K., 2009. Evaluation of a stratified continuous rumen incubation system. *Anim. Feed Sci. Tech.* 151, 32–43.
- Nakamura, F., Kurihara, Y., 1978. Maintenance of a certain rumen protozoal population in a continuous *in vitro* fermentation system. *Appl. Environ. Microbiol.* 35, 500–506.
- Narvaez, N., Wang, Y., Xu, Z., Alexander, T., Garden, S., McAllister, T., 2013. Effects of hop varieties on ruminal fermentation and bacterial community in an artificial rumen (Rusitec). *J. Sci. Food Agr.* 93, 45–52.
- Oeztuerk, H., others, 2009. Effects of live and autoclaved yeast cultures on ruminal fermentation *in vitro*. *J. Anim. Feed Sci.* 18, 142–150.
- Oeztuerk, H., Schroeder, B., Beyerbach, M., Breves, G., 2005. Influence of Living and Autoclaved Yeasts of *Saccharomyces boulardii* on *In Vitro* Ruminal Microbial Metabolism. *J. Dairy Sci.* 88, 2594–2600.
- Pearson, R.M., Smith, J.A.B., 1943. The utilization of urea in the bovine rumen. 2. The conversion of urea to ammonia. *Biochem. J.* 37, 148.
- Quin, J.I., 1943. Studies on the alimentary tract of merino sheep in South Africa. VII. Fermentation in the forestomachs of sheep. *Onderstepoort J. Vet.* 18, 91–112.
- Ramos, M.H., Kerley, M.S., 2012. Effect of dietary crude glycerol level on ruminal fermentation in continuous culture and growth performance of beef calves. *J. Anim. Sci.* 90, 892–899.
- Ramos-Morales, E., Arco-Pérez, A., Martín-García, A.I., Yáñez-Ruiz, D.R., Frutos, P., Hervás, G., 2014. Use of stomach tubing as an alternative to rumen cannulation to study ruminal fermentation and microbiota in sheep and goats. *Anim. Feed Sci. Tech.* 198, 57–66.

Shen, J.S., Chai, Z., Song, L.J., Liu, J.X., Wu, Y.M., 2012. Insertion depth of oral stomach tubes may affect the fermentation parameters of ruminal fluid collected in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 95, 5978–5984.

Slyter, L.L., Bryant, M.P., Wolin, M.J., 1966. Effect of pH on population and fermentation in a continuously cultured rumen ecosystem. *Appl. Microbiol.* 14, 573–578.

Slyter, L.L., Nelson, W.O., Wolin, M.J., 1964. Modifications of a device for maintenance of the rumen microbial population in continuous culture. *Appl. Microbiol.* 12, 374–377.

Slyter, L.L., Putnam, P.A., 1967. *In vivo* vs. *in vitro* continuous culture of ruminal microbial populations. *J. Anim. Sci.* 26, 1421–1427.

Sniffen, C.J., Ballard, C.S., Carter, M.P., Cotanch, K.W., Dann, H.M., Grant, R.J., Mandebvu, P., Suekawa, M., Martin, S.A., 2006. Effects of malic acid on microbial efficiency and metabolism in continuous culture of rumen contents and on performance of mid-lactation dairy cows. *Anim. Feed Sci. Tech.* 127, 13–31.

Soder, K.J., Brito, A.F., Rubano, M.D., 2013. Effect of supplementing orchardgrass herbage with a total mixed ration or flaxseed on fermentation profile and bacterial protein synthesis in continuous culture. *J. Dairy Sci.* 96, 3228–3237.

Soder, K.J., Brito, A.F., Rubano, M.D., Dell, C.J., 2012. Effect of incremental flaxseed supplementation of an herbage diet on methane output and ruminal fermentation in continuous culture. *J. Dairy Sci.* 95, 3961–3969.

Soto, E.C., Molina-Alcaide, E., Khelil, H., Yáñez-Ruiz, D.R., 2013. Ruminal microbiota developing in different *in vitro* simulation systems inoculated with goats' rumen liquor. *Anim. Feed Sci. Tech.* 185, 9–18.

Tamminga, M.K., Williams, B.A., 1998. *In vitro* techniques as tools to predict nutrient supply in ruminants. In: *In Vitro Techniques for Measuring Nutrient Supply to Ruminants.*, Occasional Publication-British Society of Animal Science. Deaville, E.R.,

Owen, E., Adesogan, A.T., Rymer, C., Huntington, J.A. and Lawrence, T.L.J., Edinburgh, pp. 1–11.

Teather, R.M., Sauer, F.D., 1988. A Naturally Compartmented Rumen Simulation System for the Continuous Culture of Rumen Bacteria and Protozoa. *J. Dairy Sci.* 71, 666–673.

Tilley, J. M. A., Terry, R. A., 1963. A two-stage method for the *in vitro* digestion of forage crops. *J. Brit. Grassl. Soc.* 18, 104–111.

Warner, A.C.I., 1956. Criteria for establishing the validity of *in vitro* studies with rumen micro-organisms in so-called artificial rumen systems. *J. Gen. Microbiol.* 14, 733–748.

Weller, R.A., Pilgrim, A.F., 1974. Passage of protozoa and volatile fatty acids from the rumen of the sheep and from a continuous *in vitro* fermentation system. *Brit. J. Nutr.* 32, 341–351.

Williams, C.M., Eun, J.-S., MacAdam, J.W., Young, A.J., Fellner, V., Min, B.R., 2011. Effects of forage legumes containing condensed tannins on methane and ammonia production in continuous cultures of mixed ruminal microorganisms. *Anim. Feed Sci. Tech.* 166-167, 364–372.

Woodman, H.E., Evans, R.E., 1938. The mechanism of cellulose digestion in the ruminant organism. IV. Further observations from *in vitro* studies of the behavior of rumen bacteria and their bearing on the problem of the nutritive value of cellulose. *J. Agr. Sci.* 28, 43–63.

Yang, W.Z., Laurain, J., Ametaj, B.N., 2009. Neem oil modulates rumen fermentation properties in a continuous cultures system. *Anim. Feed Sci. Tech.* 149, 78–88.

3 Risultati

3.1 Progettazione e costruzione del sistema di fermentazione

Il sistema messo a punto è un sistema di fermentazione in continuo a singola uscita (SFCC); è stato ideato con l'obiettivo di mantenere un design semplice, utilizzando materiali facilmente reperibili ed a basso costo.

Per la progettazione ci si è basati sulle descrizioni dei CC reperite in letteratura, cercando di capire quali fossero le caratteristiche fondamentali da mantenere da un punto di vista di struttura e di condizioni di incubazione.

È stata scelta la tipologia del SFCC in quanto presenta il design più semplice da un punto di vista della gestione dei flussi: la saliva artificiale viene introdotta con una pompa peristaltica (PD 5201, © Heidolph Instruments GMBH & CO KG) ad un determinato tasso controllato (e.g. 78 ml/h), ed il liquido effluente esce dal vaso di fermentazione per tracimazione allo stesso tasso. Il liquido effluente finisce poi in taniche di raccolta raffreddate da piastre eutettiche.

La semplicità di design è stata mantenuta anche per le altre componenti. I vasi di fermentazione sono bottiglie in vetro, della capacità di 2l, dotate di un'uscita laterale situata vicino al fondo della bottiglia, e di un ingresso posto sulla parte superiore; il foro di uscita è collegato ad un tubo in plastica dedicato al flusso dell'effluente, il foro di entrata viene chiuso da un tappo in gomma, dotato di un ingresso per la saliva artificiale e di un'uscita per i gas prodotti, viene utilizzato per effettuare i prelievi del liquido di fermentazione e somministrare l'alimento. Il sistema di miscelazione del liquido di fermentazione è costituito da agitatori magnetici ad immersione (12x12x3cm; Variomag™), che agitano delle ancorette magnetiche all'interno della bottiglia. Le bottiglie sono immerse in un bagno termostatico (mantenuto a 39°C) costituito da una vasca in vetro (40x80x15 cm) e da un termo-riscaldatore (ALPHA, Lauda, Germania).

La peculiarità del vaso di fermentazione è quella di far uscire come liquido effluente il liquido di fermentazione che si trova nella parte bassa della bottiglia, contenente il substrato digerito, mantenendo così un cappello fibroso e schiumoso sulla superficie del liquido. Questo cappello aiuta a mantenere le condizioni di anaerobiosi (come testimoniato anche dalle misure del potenziale redox) e funge da nicchia protettiva per la popolazione protozoaria.

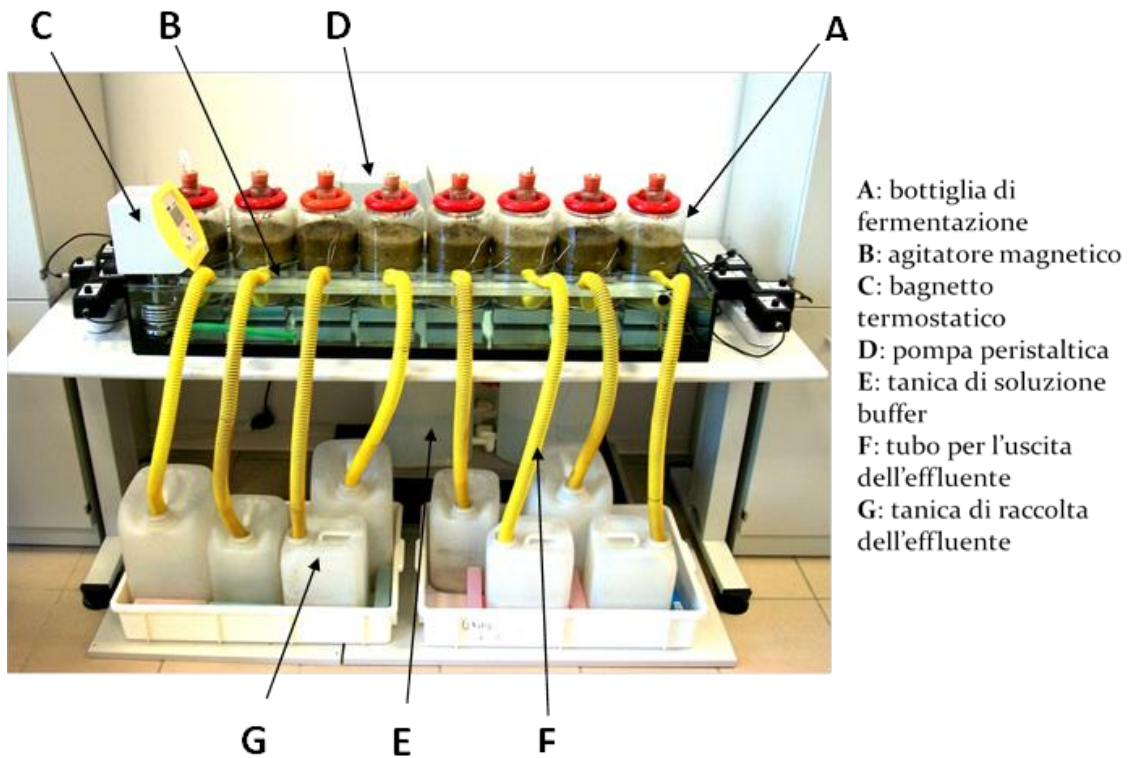


Figura 1. Illustrazione delle componenti del nuovo sistema di fermentazione in continuo

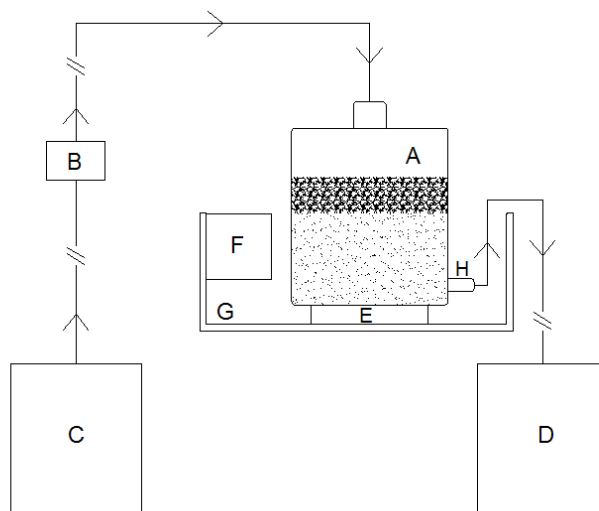


Figura 2. Design del Sistema di fermentazione. A, bottiglia di fermentazione; B, pompa peristaltica; C, tanica della soluzione buffer; D, tanica di raccolta dell'effluente; E, agitatore magnetico; F, termo riscaldatore; G, vasca in vetro; H, uscita dell'effluente (Mason et al., 2015)

Testing a stratified continuous rumen fermenter system.

F. Mason, C. Zanfi, M. Spanghero

Department of Agricultural and Environmental Sciences, University of Udine, Udine, Italy

Animal Feed Science and Technology 201: 104-109

[doi:10.1016/j.anifeedsci.2015.01.008](https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2015.01.008)

3.2 Testing a stratified continuous rumen fermenter system.

F. Mason, C. Zanfi, M. Spanghero*

Department of Agricultural and Environmental Sciences, University of Udine, Udine, Italy

*Corresponding author. Tel: +39-432-558193; Fax: +39-432-558199;

EM: mauro.spanghero@uniud.it

Abstract

Two trials were aimed at finding the proper settings of a novel continuous-culture rumen fermenter (CCF) capable of maintaining the protozoa population and reduce the accumulation of undigested materials in the fermentation vessels. The CCF consists of 8 x 2 L glass bottles, warmed at 39°C and placed on a water proof magnetic stirrer. Bottles are closed with a rubber stopper, with an insert for the inflow of artificial saliva, and have the outflow at the base.

In *Experiment 1* was evaluated the effect of two stirring frequencies (continuous vs intermittent, S1 and S2) and two dilution rates (1.29 vs 1.04) on the pH level and on the counts of the protozoa population in the fermentation fluid. The pH reached a steady state after 4 d of fermentation and S1 bottles had lower pH than those S2 (6.50 vs 6.57, $P < 0.01$). The protozoa in the rumen fluid (from $5.14 \cdot 10^5$ /ml) declined sharply in the first 3 d of fermentation and stabilized at about $13 \cdot 10^3$ /ml in the S2 flasks, while the S1 flasks had lower protozoa concentrations (about $0.8 \cdot 10^3$ /ml, $P < 0.001$). The dilution rates had no effects on pH and protozoa.

The *Experiment 2* aimed to test the effects of varying the daily feed (F) amount (15, 20, 25, 30 g DM/d of a diet with 50:50 forage: concentrate ratio) on the organic matter (OM) digestibility (OMD) and on the fermentative patterns. In 2 fermentation runs of 8 d each, bottles were inoculated with 450 ml of rumen fluid and 1050 ml of artificial saliva, which was then in flowed at 78 ml/h.

Lowering F reduced the OM accumulated inside the vessels (from 5.06 to 0.68 g/d; $P < 0.0001$) but not affected the OMD between dietary treatments (range between 0.460 and 0.510). The reduction of F led to ($P < 0.001$) a linear decrease in volatile fatty acids

concentration (from 65.82 to 45.25 mM), to an increase of acetate: propionate ratio (from 2.91 to 3.42) and to a reduction of pH (from 6.4-6.5 to 6.0-6.1). Lowering F tended to regularly increase the number of protozoa (from 72 to 198*10³/ml, P=0.082).

The tested CCF has demonstrated to be suitable to stabilize the conditions of fermentation after some days of adaptation as well to maintain a viable protozoa population and to limit the accumulation of undigested materials in the fermentation vessels.

Keywords: continuous rumen fermenter, in vitro, protozoa, rumen

Abbreviations: CCF, continuous-culture rumen fermenter; CP, crude protein; D, dilution rate; DM, dry matter; F, feeding level; F/B, feed to buffer ratio; NDF, neutral detergent fibre; N-NH₃, ammonia nitrogen; OM, organic matter; OMD, organic matter digestibility; S, mode of stirring; VFA, volatile fatty acids.

1. Introduction

Continuous-culture rumen fermenters (CCF) are complex and elaborated artificial systems that try to reproduce what happens in the rumen in a most comprehensive way. They supply a continuous influx of mineral solution and provide a means for the continuous removal of fermentation liquid with a daily addition of substrate.

For many years scientists have attempted to simulate the complex rumen conditions and functions in vitro employing different apparatus (Hoover et al., 1976; Czerkawski and Breckenridge, 1977; Teather and Sauer, 1988; Miettinen and Setälä, 1989). These systems should primarily reproducing rumen conditions (e.g. pH, turn-overs, temperature, etc.) but also be as simple as possible, designed using inexpensive components and requiring low management (Slyter et al., 1964; Vatthauer et al., 1970; Teather and Sauer, 1988). However, the need to mimic an in vivo very complex physiological function has revealed various limits of the available CCF systems.

Two of the main limitations are maintaining the protozoa population and avoiding a progressive accumulation of undigested materials in the fermentation flasks (Teather and Sauer, 1988). The latter problem can be solved by equipping the fermenter with an efficient mixing system of the fermenter contents and a proper overflow outlet. However, this solution generally depresses the protozoa population, which cannot feed adequately if artificially stirred (Coleman, 1980) and require a space in the fermentation vessel "... where they can become sequestered with a removal rate considerably less than that of fluid turnover (Weller and Pilgrim, 1974)".

On these bases we developed a new CCF, which is based on previous experience of Teather and Sauer (1988) and Muetzel et al. (2009) and allows the formation of a stratified rubber mat in the flasks by adopting a gentle system of mixing and an outflow at the bottom of the flasks. The apparatus is a tentative to optimize the conditions for the survival of an appreciable protozoa population and minimizing the accumulation of undigested material in fermentation flasks. Moreover, our system is easily replicable, because it has a simple design, uses inexpensive materials and has low management requirements. We think that the description of this system and a discussion of its fermentative conditions would be helpful for researchers interested in organizing a similar rumen CCF. In this paper we present the results of two experimental trials aimed at finding the proper settings of this novel system capable of maintaining the protozoa population (stirring settings) and reduce the accumulation of undigested materials in the fermentation vessels (feeding level).

2. Material and methods

2.1. Incubation system

The system consists of 8 x 2 L glass bottles, immersed in a bain-marie warmed at 39°C. Each bottle is placed on a water proof magnetic stirrer (Variomag™) and is closed with a rubber stopper with an insert for the inflow of artificial saliva equipped with a PE overflow tube. A peristaltic pump (PD 5201, © Heidolph Instruments GMBH & CO KG) supplies the buffer solution (60% McDougall solution, 40% tap water; Hoover et al., 1976) from a reservoir to the fermenters (fig.1).

The outflow at the base of the bottles allows a stratification of the feeding material: the less dense particles form a matter cap on the top of the fermentation fluid, useful for maintaining the anaerobic condition of the liquid and provides a protective niche for protozoa, while the more dense material precipitates at the bottom and flows out through the outflow exit.

2.2. Incubation conditions

Rumen fluid is collected from cattle immediately after slaughter, stored in thermal containers to maintain a temperature of 39°C, and immediately transported to the laboratory. Here the fluid is strained through a 100 µm wire mesh strainer (this pore size allow the passage of the protozoa population during the straining) and diluted with pre-

warmed artificial saliva (60% McDougall solution, 40% tap water; Hoover et al., 1976). The filled bottles were flushed with CO₂ and then closed with a rubber stopper.

Experiment 1: the effect of the dilution rate (D) and the mode of stirring (S) on pH and protozoa survival in the fermentation fluid was tested. Four bottles were subjected to continuous (S1) and 4 to intermittent stirring (S2, 1 min of stirring every 30 min). Within each stirring treatment, 2 bottles contained a volume of liquid of fermentation of 1500 ml (450 ml of strained rumen liquid and 1050 of artificial saliva) and the others 2 bottles of 1800 ml (540 ml of strained rumen liquid and 1260 of artificial saliva), corresponding to a calculated D values of 1.29 (D1) and 1.04 (D2), respectively. The trial lasted 10d and the bottles were supplied with 25 g/d of a total mixed diet for cattle (40:60, compound feed: hay ratio), divided into 2 equal portions (at 9.00 and 17.00).

Experiment 2: the aim was to find the appropriate amount of substrate needed daily to minimize the accumulation of the undigested material in the bottles. In a trial divided into 2 fermentation runs of 8 d each (5 adaptation days and 3 measuring days), four amounts of substrate (F) were tested (15, 20, 25, 30 g DM/d). The feed consisted of a mixed diet with 50:50 forage: concentrate ratio (20% meadow hay, 30% alfalfa, 20% corn grain, 30% compound feed), which was manually provided twice a day (at 9.00 and 17.00) in two equal portions. Each bottle was inoculated with 450 ml of rumen fluid and 1050 ml of artificial saliva and then in flowed at 78 ml/h (providing a D of 1.29 vol/d, and 5% of liquid substitution). The mixing was set at 1 min of stirring every 30 min.

2.3. Samplings and chemical analysis

The feed ingredients used as substrate were ground through a 1.0-mm screen (Ciclotec Tecator) and then mixed to obtain the total mixed ration, which was then analyzed for DM, ash, crude protein, (CP; AOAC, 1998) and neutral detergent fiber (aNDF, Van Soest et al., 1991) using the Ankom apparatus (Ankom, Tech. Co., Fairport, NY, USA). In both experiments the substrate mixture daily introduced in the bottles contained 120-130 and 340-360 g/kg DM, respectively of CP and NDF.

Experiment 1: during the whole experiment a sample of fermenting fluid was collected daily from each bottle (in duplicate) to be analyzed for the pH, by a pHmeter (Crison), and for protozoa counting, according to Dehority (2003).

Experiment 2: for each fermentation run, a sample of rumen fluid was dried (72 h at 60°C) and the residue ground through a 1.0-mm screen (Ciclotec Tecator) and analyzed for the residual DM and ash content. During the last three days of each fermentation run,

the liquid out flowed from each bottle in the previous 24 h was weighted and samples collected for DM and ash analysis. From each bottle, the fermenter fluid was sampled before the evening feeding, acidified with H₂SO₄ (0,1N 1:1) and then analyzed for the volatile fatty acid (VFA) and ammonia nitrogen content. Samples for VFA analysis were centrifuged at 20,000 × g for 30 min at 20 °C. Supernatants were filtered using polypore 0.45m filters (Alltech Italia, Milan, Italy) and the filtrate was injected into a high performance liquid chromatography instrument (Perkin-Elmer, Norwalk, CN, USA), set to 220 nm according to method described by Martillotti and Puppo (1985). Ammonia samples were analysed following the Nessler method M.U. 632-84 (D.M. 12/07/90). A further sample of the fermenter fluid was collected from each bottle and used for the protozoa counting (according to Dehority, 2003).

At the end of each fermentation run, the contents of the bottles were collected and dried (72 h at 60°C): the dried residue was milled and analyzed for the residual DM and ash content. The amount of OM of the rumen inoculum inserted at the beginning of the fermentation runs in bottles and the amount of salts of the buffer were subtracted from the OM residue of each bottle, to calculate the daily amounts of the undigested substrate accumulated in the bottles.

2.4. Calculations and statistical analysis

The values of pH and protozoa counts measured in the first experiment in each bottle of the fermenter, were analyzed, for each of the last three days of fermentation, with a 2 x 2 factorial model which considered the frequency of stirring (continuous vs intermittent) and the dilution rate (1.29 vs 1.04).

The data of the second experiment were analyzed as a completely randomized design, using 4 treatments (e.g. 4 amounts of feeds) with fermenter as the experimental unit and the fermentation run as a block. The Student-Newman-Keuls multiple range test was used to compare averages and significant differences were declared at P<0.05 and at P<0.01 and trends at P<0.10. Orthogonal polynomial contrasts were used to evaluate the linear and quadratic relationships.

3. Results and discussion

Continuous rumen fermenters are expected to mimic the overall in vivo conditions, but the main rumen environmental traits which have to be primarily guaranteed are a steady-

state pH at sub-acidic levels, to maintain the original microbial population and to avoid the accumulation of undigested materials in the fermentation bottles.

In *Experiment 1* we evaluated the effect of two stirring frequencies (continuous vs intermittent) and two dilution rates (D, 1.29 vs 1.04) on the pH level and the protozoa population; the results are shown in fig. 2. The D didn't have any significant effects on these parameters, while the stirring frequency significantly affected pH (fig. 2a) and protozoa population (fig. 2b).

The rumen protozoa is a relevant microbial fraction (e.g. about 50% of microbial mass, Nagaraja, 2012) having essential functions at rumen level (e.g. interactions with methanogen bacteria, competition with bacteria, etc.) and their absence can widely modify the rumen fermentation pattern (Belanche et al., 2011). However, it is well known that the inability to maintain the original protozoa population is a weak point of the CCF systems (Teather and Sauer, 1988; Muetzel et al., 2009). It is worth noting that Hristov et al. (2012) examined 1074 studies on CCF and found that only 227 reported protozoa data probably because the CCF are not designed to maintain protozoa population for long periods.

We focused our efforts in setting up the CCF to maintain an appreciable fraction of the protozoa population: in our experiment the protozoa in the rumen fluid (from $5.14 \cdot 10^5$ /ml) declined sharply in the first two days of in vitro fermentation. However, as can be seen from figure 2b, in the flasks with intermittent stirring the protozoa stabilized at a concentration of about $13 \cdot 10^3$ /ml, which are values comparable with the data found in literature (Miettinen and Setälä, 1989; Hristov et al., 2012). The continuously stirred flasks had lower protozoa concentrations (about $0.8 \cdot 10^3$ /ml, $P < 0.001$), which decreased below a detection limit during the last day of the experiment. Also Carro et al. (2009) reported a complete disappearance of protozoa after 7 days of incubation in a CCF system constantly homogenized.

In our system pH reached a steady state after 4 days of fermentation (fig. 2a) and this probably indicates that equilibrium of the system's environment was reached. Therefore a short adaption period lasting at least 4 d could be adopted as described for other systems (Brooks et al., 2012; Fuentes et al., 2011). Looking at the sampling period, pH was effected by the stirring settings, in particular the bottles continuously stirred had lower pH than those intermittently stirred (6.50 vs 6.57, $P < 0.01$).

The feed to buffer ratio (F/B) is a crucial parameter of the CCF systems and Cantalapiedra-Hijar et al. (2011) pointed out that “the amount of feed supplied to single-flow CCF in which pH is not under control with regard to the infused buffer should be carefully chosen for the purpose of simulating ruminal fermentation”. On this basis, *Experiment 2* aimed to test the effects of varying the daily feed amount (F) on the OM balance and on the fermentative pattern (Table 1), with a constant daily buffer infusion (approx. 1870 ml) in this system. Lowering F from 30 to 15 g DM/d had no effects on the total effluent flow, but there was a regular reduction in DM of the effluent fluid (from 10.90 to 9.80 g DM/kg; $P < 0.0001$) and a progressive increase of the ash (from 542 to 632 g/kg DM; $P < 0.0001$). Overall decreasing F progressively resulted in a reduction in the amount of flowed OM (from 9.51 to 6.09 g OM/d; $P < 0.0001$) and also in the quantity of undigested OM accumulated inside the vessel (from 5.06 to 0.68 g/d; $P < 0.0001$). Nevertheless there were no differences in the OM apparent digestibility, corrected for the quantities accumulated inside the bottles, which reached values consistent of those found in literature (Hristov et al., 2012; Muetzel et al., 2009).

The pH of the fermentation fluid was measured immediately before feedings and the afternoon measurement (06.00 pm) was 0.9-1.0 pH points lower than the morning measure. This was due to the specific feeding schedule with consists of a shorter period between the two diurnal administrations (9 h, from 09.00 to 06.00 pm) than that from the evening and the subsequent administration (15 h). The pH decreased regularly ($P < 0.0001$) by about 0.12-0.15 for each feed increment, starting from values of 6.4-6.5 and reaching the lowest values of 6.0-6.1. Therefore under the conditions evaluated, and with a diet of forage: concentrate of about 50:50 we confirm that 15-20 g/d of feed provided a favorable conditions for the growth of microorganism strains sensitive to acidic environment (e.g. cellulolytic bacteria and protozoa).

According to Cantalapiedra-Hijar et al. (2011), the different pH level, as result of different F/B, affects the individual VFA molar proportions. In our experiment, a reduction of F led to a linear decrease in total VFA concentration in the liquid (from 65.82 to 45.25 mM; $P = 0.0005$), of propionate proportion (from 21.50 to 19.48 mol/100mol; $P < 0.004$), but an increase in acetate proportion (from 60.91 to 64.52 mol/100mol; $P < 0.0001$); reducing F resulted then in an increased A:P ratio (from 2.91 to 3.42), as reported from Cantalapiedra-Hijar et al. (2011). The VFA concentrations measured in our CCF are comparable to values of Eun et al. (2004) and Gudla et al.

(2012) and Muetzel et al. (2009) consider that a concentration below 75 mM is useful in maintaining an active protozoal population in the fermenters (Muetzel et al. 2009). Ammonia nitrogen concentrations showed a regular decrease with lowering F (from 1.11 to 0.75 mg/dl; P=0.0109).

Finally, reduction of F followed a trend (P=0.082) resulting in a regular increase in the number of protozoa (from 72 to 198×10^3 /ml).

Hence, lowering F from 30 to 15 g/d reduced the quantities accumulated from approximately 20 to 5% of the daily amount of OM fed to the bottles: we consider this latter entity of accumulation satisfactory since it permits a high survival of protozoa without altering digestibility values and with variations of pH (increase) and VFA concentration (decrease) within the physiological rumen range. Moreover, fermenters having low accumulations are desirable because possible inaccuracies in measurement of the accumulated matter are translated in digestibility calculations.

5. Conclusions

The tested CCF has demonstrated to be suitable to stabilize the conditions of fermentation after some days of adaptation as well to maintain a viable protozoa population. If the amount of feed is properly administered there is a limited accumulation of undigested materials in the fermentation vessels, while the fermentation patterns are maintained within acceptable ranges.

References

Association of Official Analytical Chemists, 1998. Official Methods of Analysis, 16th ed. AOAC, Chemists, Gaithersburg, MD, USA.

Belanche, A., Abecia, L., Holtrop, G., Guada, A.J., Castrillo, C., de la Fuente, G., Balcells, J., 2011. Study of the effect of the presence or absence of protozoa on rumen fermentation and microbial protein contribution to the chyme. *Journal of Animal Science* 89, 4163-4174.

Brooks, M.A., Harvey, R.M., Johnson, N.F., Kerley, M.S., 2012. Rumen degradable protein supply affects microbial efficiency in continuous culture and growth in steers.

Journal of Animal Science 90, 4985-4994.

Cantalapiedra-Hijar, G., Yáñez-Ruiz, D.R., Newbold, C.J., Molina-Alcaide E., 2011. The effect of the feed-to-buffer ratio on bacterial diversity and ruminal fermentation in single-flow continuous-culture fermenters. *Journal of Dairy Science* 94, 1374-1384.

Carro, M.D., Molin-Alcaide, E., Moumen, A., Yáñez Ruiz, D.R., 2009. Protozoa evolution in single-flow continuous culture and Rusitec fermenters fed high-forage diets. In: Papachristou, T.G. (ed.), Parissi, Z.M. (ed.), Ben Salem, H. (ed.), Morand-Fehr, P. (ed.). *Nutritional and foraging ecology of sheep and goats*. Zaragoza : CIHEAM / FAO / NAGREF. p.303-308 (Options Méditerranéennes : Série A. Séminaires Méditerranéens; n. 85).

Coleman, G. S., 1980. Rumen ciliate protozoa. In: Lumsden W. H. R., Muller R., Baker J. R., (ed.), *Advances in Parasitology*. Academic Press, Sydney 18, 121–173.

Czerkawski, J. W., Breckenridge, G., 1977. Design and development of a long-term rumen simulation technique (Rusitec). *British Journal of Nutrition* 38, 371-384.

Dehority, B.A., 2003. *Rumen Microbiology*. Nottingham University Press, Nottingham.

D.M. 12/07/1990. Linee guida per il contenimento delle emissioni inquinanti degli impianti industriali e la fissazione dei valori minimi di emissione. G.U. 30/07/1990 n.174.

Eun, J-S, Fellner, V., Gumpertz, M.L., 2004. Methane production by mixed ruminal cultures incubated in dual-flow fermentors. *Journal of Dairy Science* 87, 112-121.

Fuentes, M.C., Calsamiglia, S., Fievez, V., Blanch, M., Mercadal, D., 2011. Effect of pH on ruminal fermentation and biohydrogenation of diets rich in omega-3 or omega-6 fatty acids in continuous culture of ruminal fluid. *Animal Feed Science and Technology* 169, 35-45.

Gudla, P., AbuGhazaleh, A.A., Ishlak, A., Jones, K., 2012. The effect of level and oil supplement on biohydrogenation intermediates and bacteria in continuous cultures. *Animal Feed Science and Technology* 171, 108-116.

Hoover, W. H., Crooker, B. A., Sniffen, C. J., 1976. Effects of differential solid-liquid removal rates on protozoa numbers in continuous culture of rumen contents. *Journal of Animal Science* 43, 528–534.

Hristov, A.N., Lee, C., Hristova, R., Huhtanen, P., Firkins, J.L., 2012. A meta-analysis of variability in continuous-culture ruminal fermentation and digestibility data. *Journal of Dairy Science* 95, 5299-5307.

Martillotti, F., Puppo, S., 1985. Liquid chromatographic determination of organic acids in silages and rumen fluids. *Annali dell'Istituto Sperimentale per la Zootecnia*. 18, 1-10.

McDougall, E. I., 1948. Studies on ruminant saliva. I. The composition and output of sheep's saliva. *Biochemical Journal* 43, 99–109.

Miettinen, H., Setälä, J., 1989. Design and development of a continuous culture system for studying rumen fermentation. *Journal of agricultural science in Finland* 61, 463-473.

Muetzel, S., Lawrence, P., Hoffmann, E.M., Becker, K., 2009. Evaluation of a stratified continuous rumen incubation system. *Animal Feed Science and Technology* 151, 32-43.

Nagaraja, T., 2012. A microbiologist's view on improving nutrient utilization in ruminants. 23rd Annual Ruminant Nutrition Symposium (P .149175). Gainesville, Florida, University of Florida Dairy Extension.

Slyter, L. L., Nelson, W. O., Wolin, M.J., 1964. Modification of a device for maintenance of the rumen microbial population in continuous culture. *Applied Microbiology* 12, 374-377.

Teather, R. M., Sauer, F., 1988. A Naturally Compartmented Rumen Simulation System

for the Continuous Culture of Rumen Bacteria and Protozoa. *Journal of Dairy Science* 71, 666-673.

Van Soest, P.J., Robertson, J.B., Lewis, B.A., 1991. Methods of dietary fiber, neutral detergent fiber and non polysaccharides in relation to animal nutrition. *Journal of Dairy Science* 74, 3583–3597.

Vatthauer, R. J., Hinds, F. C., Garrigus, U. S., 1970. Continuous in vitro culture system for ruminant research I. Design. *Journal of Animal Science* 30, 618-623.

Weller, R.A., Pilgrim, A.F., 1974. Passage of protozoa and volatile fatty acids from the rumen of a sheep and from a continuous in vitro fermentation system. *British Journal of Nutrition* 32, 341-351.

Table 1. Fermentation characteristics of Continuous Culture Fermenters with varying the daily feed amount (F).

	Daily amount of feed (g DM), F				RMSE*	P-values		
	15	20	25	30		F	Linear	Quadratic
Effluent								
-Total wet g/d	1883	1860	1904	1907	61	0.688	0.422	0.691
-DM, g/kg	9.8 ^{Bc}	9.4 ^{Bb}	10.5 ^{Aa}	10.9 ^{Aa}	0.3	<0.001	<0.001	0.323
-Ash, g/kg DM	632 ^a	595 ^b	550 ^c	542 ^c	88	<0.001	<0.001	0.008
OM balance, g/d								
-Flowed	6.1 ^{Cc}	7.1 ^{Bb}	9.0 ^{Aa}	9.5 ^{Aa}	0.3	<0.001	<0.001	0.116
-Accumulated	0.7 ^{Dd}	1.9 ^{Cc}	3.5 ^{Bb}	5.1 ^{Aa}	0.2	<0.001	<0.001	0.140
-Digested	6.5 ^{Cd}	8.8 ^{Bc}	9.8 ^{Bb}	12.4 ^{Aa}	0.5	<0.001	<0.001	0.668
Apparent digestibility, OM	0.51	0.51	0.46	0.47	0.03	0.044	0.022	0.588
pH 9am	6.50 ^{Aa}	6.37 ^{Bb}	6.23 ^{Cc}	6.06 ^{Dd}	0.04	<0.001	<0.001	0.360
pH 6pm	6.41 ^{Aa}	6.30 ^{Ab}	6.13 ^{Bc}	5.99 ^{Cd}	0.06	<0.001	<0.001	0.509
VFA								
Total, mM	45.3 ^{Bb}	46.7 ^{Bb}	58.7 ^{ABb}	65.8 ^{Aa}	9.2	<0.001	<0.001	0.897
Individual, mol/100mol								
Lattate	0.78	0.71	0.60	0.41	0.35	0.183	0.034	0.645
Acetate (A)	64.5 ^{Aa}	64.3 ^{Ab}	62.4 ^{Bb}	60.9 ^{Bc}	1.1	<0.001	<0.001	0.131
Propionate (P)	19.5 ^{Bb}	20.2 ^{ABb}	20.5 ^{ABab}	21.5 ^{Aa}	1.0	<0.004	<0.001	0.723
Butyrate	11.3	10.8	11.3	12.1	1.2	0.192	0.107	0.154
Valerate	2.0	1.8	2.5	2.1	0.5	0.131	0.245	0.723
Isobutyrate	1.3	1.6	1.5	1.7	0.5	0.495	0.165	0.936
Isovalerate	0.63 ^{Bb}	0.54 ^{Bb}	1.25 ^{Aa}	1.19 ^{Aa}	0.29	<0.001	<0.001	0.909
A:P ratio	3.4 ^{Aa}	3.2 ^{ABab}	3.1 ^{Bbc}	2.9 ^{Bc}	0.2	<0.001	<0.001	0.897
N-NH ₃ , mg/dl	0.75 ^b	0.75 ^b	0.93 ^{ab}	1.11 ^a	0.23	0.011	0.002	0.280
Protozoa, x10 ³ /ml	197.6	131.4	104.0	72.0	65.6	0.082	0.015	0.598

*RMSE: mean square error

Means with different superscripts differ (^{A-B-C-D}, $P < 0.01$, ^{a-b-c-d} $P < 0.05$).

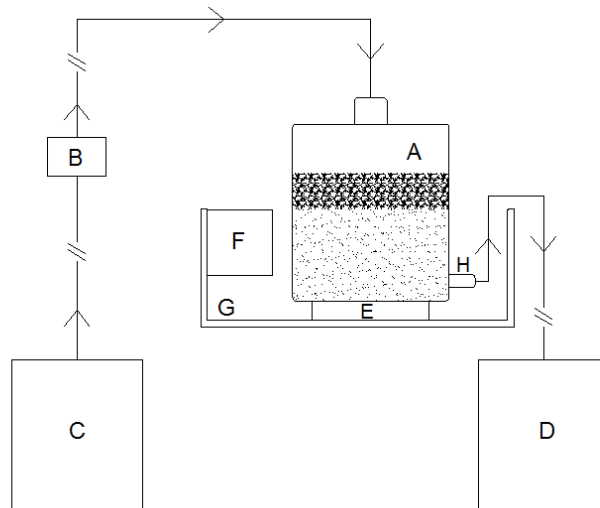


Figure 1. Layout of the fermenter. A, glass bottle; B, peristaltic pump; C, buffer reservoir; D, effluent tank; E, magnetic stirrer; F, heater; G, waterbath; H, outflow. Fluids terminology: fermentation fluid (liquid contained in glass bottle A), ruminal liquid (original rumen inoculum inserted in the glass bottle A at the beginning of fermentation), buffer solution (mineral liquid inserted in the glass bottle A at the beginning of fermentation and continuously pumped in the glass bottle A from the reservoir C), effluent liquid (fermentation fluid outflowed from the glass bottle A in the tank D).

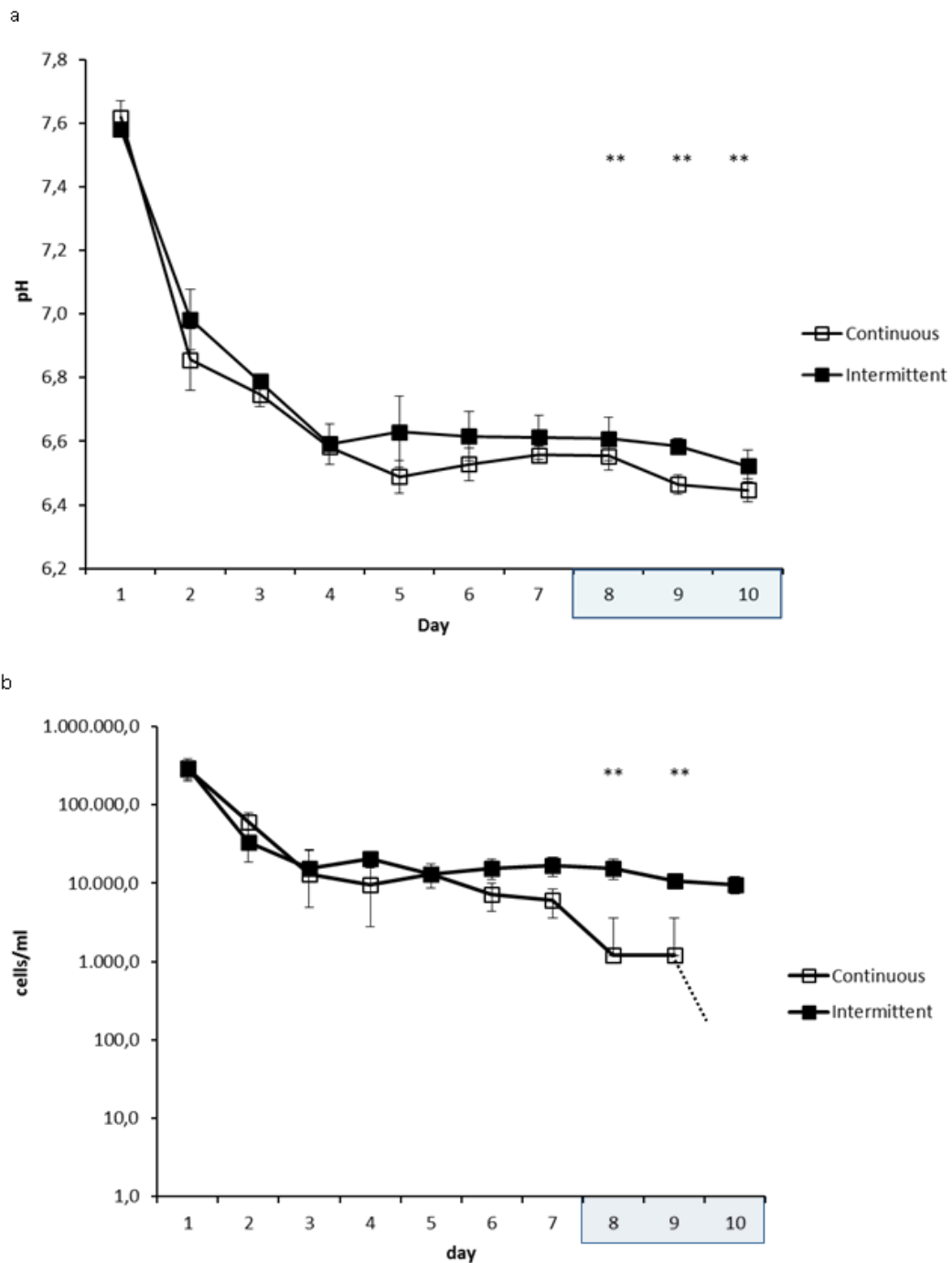


Figure. 2. pH values (a) and protozoa numbers (b) of the fluid of fermentation during experiment 1 as affected by stirring frequency (bars are the within group standard deviations; **: $P < 0.01$; pH root mean square error: day 8:0.05, day 9:0.03, day 10:0.02. Protozoa numbers root mean square error: day 8:4157, day 9:2400, day 10: not calculable)

Continuous culture system fed with urea partitioned in different administrations or added in slow form to different fiber diets.

Mason F.¹, Zanfi C.¹, Spanghero M.¹, Eun, J-S.²

¹ *Department of Agricultural and Environmental Sciences, University of Udine, Udine, Italy*

² *Department of Animal, Dairy, and Veterinary Sciences, Utah State University, Logan, UT 84322, USA*

Experiment 2 will be presented at the ADSA-ASAS Joint Annual Meeting 2015, (Orlando, FL; USA):

Assessment of in vitro ruminal fermentation characteristics of lactation dairy diets supplemented with slow-release urea using continuous cultures

The present study investigated the effects of supplementing slow-release urea (SRU; Optigen, Alltech, Nicholasville, KY) in 3 lactation dairy diets with different forage-to-concentrate ratios (F:C) on in vitro ruminal fermentation characteristics. The experiment was performed in a 3 (F:C) × 2 (without vs. with SRU supplementation) factorial design with 4 independent runs of continuous cultures (n = 4). Supplementing SRU considerably reduced dietary concentrations of mixture of soybean meal and canola meal (50:50 on a DM basis). Continuous culture apparatus consisted of 700-mL working volume fermentation vessels to measure major fermentation end-products. Each culture was offered a diet of 20 g DM/d in 2 equal portions at 0800 and 2000 h. Decreasing forage proportion reduced ruminal pH ($P < 0.01$), but supplementing SRU did not influence ruminal pH. Manipulating F:C did not affect total VFA concentration; however, under high-forage diet (HF; 63% forage) supplementing SRU increased total VFA concentration, while SRU supplementation in medium-forage diet (MF; 50% forage) decreased total VFA concentration, leading to an interaction between F:C and SRU ($P = 0.02$). Decreasing forage proportion decreased acetate proportion, but increased propionate proportion, resulting in a tendency to decrease acetate-to-propionate ratio ($P = 0.09$). In contrast, SRU supplementation did not affect individual VFA proportions. Decreasing F:C decreased ammonia-N concentration, whereas supplementation of SRU tended to increase concentration of ammonia-N ($P = 0.08$). While methane production decreased with decreasing F:C ($P < 0.01$), supplementing SRU tended to increase methane production ($P = 0.07$) mainly due to its sizable increase in MF, leading to a tendency of F:C × SRU interaction ($P = 0.06$). Overall results in the current study indicate that supplementing SRU would be more beneficial in HF with enhanced ruminal fermentation evidenced by increased total VFA concentration.

Key words: forage-to-concentrate ratio, ruminal fermentation, slow-release urea

F. Mason¹, K. Neal², S. Y. Yang², J.-S. Eun^{2*}, and M. Spanghero¹.

¹Department of Agricultural and Environmental Science, University of Udine, 33100 Udine, Italy, ²Department of Animal, Dairy, and Veterinary Sciences, Utah State University, Logan, UT 84322, USA.

3.3 Continuous culture system fed with urea partitioned in different administrations or added in slow form to different fiber diets.

Experiment 2 will be presented as poster at the ADSA-ASAS Joint Annual Meeting 2015, (Orlando, FL; USA).

Mason F.¹, Zanfi C.¹, Spanghero M.¹, Eun, J-S.²

¹ *Department of Agricultural and Environmental Sciences, University of Udine, Udine, Italy*

² *Department of Animal, Dairy, and Veterinary Sciences, Utah State University, Logan, UT 84322, USA*

1. Introduction.

Urea is used in ruminant diets as a source of nitrogen for ruminant microbial population. It is rapidly transformed to ammonia and incorporated within rumen bacteria to form proteins which are later digested. However, the very rapid and intense degradation generally exceeds the bacteria's capacity to utilize all the ammonia with the excess being absorbed directly into the rumen wall where it enters the blood. Ammonia is toxic for the animal and therefore requires rapid transformation to urea in the liver, which is then excreted in the urine.

A way to avoid the problems of toxicity and improve the efficiency of rumen utilization is to slow urea's degradation by coating the urea granules with materials able to protect it from degradation slowing its release. Several techniques and materials (such as CaCl₂, fats of different origin, urea –calcium mixture, etc.) have been developed (Cherdthong et al., 2011; Galo et al., 2003; Xin et al., 2010) to obtain a delay in urea's rumen degradation. However, an accurate knowledge of the most appropriate rate of degradation for the optimal usage of urea nitrogen is not available, while several experiments have only tested protected urea products having specific kinetics of release (Cooke et al., 2008; Holder et al., 2013; Highstreet et al., 2010).

The present trial was organized in two experiments. In the first experiment, a specified dose of urea was used to simulate the regular release of nitrogen in the rumen in a continuous fermenter environment. The aim was to study rumen metabolism at controlled defined conditions of release of nitrogen to identify the conditions for the optimal matching between nitrogen release and the rumen bacterial degradation of the carbohydrate fraction.

A second experiment was planned to test a commercial slow release product in diets differing in the degradability of the carbohydrate fraction. Several studies have attempted to examine the effect of addition of protected urea in diets containing carbohydrates with different degradability, such as starch differing in origin and/or thermal treatments (Xin et al., 2010; Cherdthong et al., 2011; Zinn et al., 2003; Ceconi et al., 2015) and sugars (Golombeski et al., 2006).

On the contrary, there is no information about the effect of a slow release urea in diets differing in the degradability of the fiber fraction. It is known that rumen degradation of fiber, in addition to difference of botanic origin of plants (e.g. graminaceous vs legumes), differs widely according to parts of plants (e.g. fiber in seeds, hulls, roots, etc.) and it is generally accepted that whole plant fibers have a lower degradability than fiber of some byproducts (Spanghero et al., 2010). The second experiment aimed to evaluate the impact of a slow release urea product when used in diets where forages (e.g. corn silage and hay) were substituted with fiber sources, having an expected higher degradability of the fiber (e.g. wheat bran, distillers, etc.).

2. Material and methods.

Two experiments were conducted using two single flow continuous culture systems available at the Department of Agricultural and Environmental Sciences of Udine University (experiment 1) and at the Department of Animal, Dairy, and Veterinary Sciences of Utah State University (experiment 2).

2.1 Experiment 1.

2.1.1. Incubation conditions

The system consists of 8x21 glass bottles, immersed in a bain-marie warmed at 39°C. Every bottle is closed with a rubber stopper with an insert for the inflow of artificial saliva, is equipped with a polyethylene overflow tube, and lays on a waterproof magnetic stirrer (VariomagTM © Thermo Fisher Scientific Inc., Germany). A peristaltic pump (PD 5201, © Heidolph Instruments GMBH & CO KG, Germany) pumps the buffer solution from a reservoir to the fermenters. Inoculum was collected post mortem from the rumen of six lactating dairy cows (about 700 ml of rumen fluid from each cow) at a slaughterhouse and maintained in anaerobic conditions at 39°C during the 20 min transportation to the laboratory. Here the fluid was strained through a 100 µm wire mesh

strainer (this pore size allows the passage of the protozoa population during the straining). Each bottle was then inoculated with 400 ml of filtered rumen liquid and 1050 ml of pre-warmed artificial saliva (60g/100g McDougall solution; McDougall 1948, and 40g/100g tap water; Hoover et al., 1976). The filled bottles were flushed with CO₂ and then closed with a rubber stopper.

The trial consisted of 2 runs of 7 days each (4 adaptation days and 3 measuring days). The bottles were intermittently stirred for 30 seconds every 15 minutes, and received the buffer solution at 78 ml/h, giving a dilution rate (D) of 1.29. The fermenters were supplied with a diet containing corn silage (50 % DM), dry corn (42.5% DM) and a mineral vitamin supplement (6% DM). All the ingredients were dried, milled (1 mm screen), mixed and 12 g/d of dry matter (DM) was divided into 2 equal portions and fed at 9:00 and 15:00. Each portion of the diet was supplemented with a dose of 0.09 g of urea (0.18 g/d, corresponding to 1.5% of daily feeding amount) which was administered according to the following 4 modes: whole dose amount at feeding time (U1 at 09:00 and 15:00), the dose split in 2 equal fractions (U2- at 9:00, 10:00 and 15:00, 16:00), the dose split in 3 equal fractions (U3- at 9:00, 10:00, 11:00 and 15:00, 16:00, 17:00) and the dose split in 4 equal fractions (U4- at 9:00, 10:00, 11:00, 12:00 and 15:00, 16:00, 17:00, 18:00).

2.1.2. Sampling and chemical analyses

From d 5 to d 7, pH of the fermenting fluid was measured with a pH meter (GLP 22, © Crison Instruments S.P.A., Spain) and recorded at each feeding time before adding the feed (9:00 and 15:00), and every hour after feeding for 3 hours (at 10:00, 11:00, 12:00 and at 16:00, 17:00, 18:00). At the same sampling times, samples of the fermentation liquid were collected for N-NH₃ analysis (then acidified with H₂SO₄ 1N). Before feeding, the fermenting fluid of every bottle was sampled for volatile fatty acids (VFA) analysis (samples acidified with H₂SO₄ 0.1N) and for protozoa counting. Every morning effluents were removed, the weights and volumes were recorded, and sampled (150 ml each). At the end of the trial, effluent subsamples from the 3 sampling days were pooled together, homogenized, and freeze-dried for further analysis. On the last day, the whole fermenting content was collected from the bottles and dried at 60°C in an oven for DM and OM determinations.

The ingredients used for the diets were ground through a 1.0-mm screen (CiclotecTecator) and the diet mix was then analyzed for DM, OM, CP, (AOAC, 2000) and neutral detergent fiber (aNDF, Van Soest et al., 1991) using the Ankom apparatus (Ankom, Tech. Co., Fairport, NY, USA).

Samples for VFA analysis were centrifuged at $20,000 \times g$ for 30 min at 20°C. Supernatants were filtered using polypore 0.45m filters (Alltech Italia, Milan, Italy) and the filtrate was injected into a high performance liquid chromatography instrument (Perkin-Elmer, Norwalk, CN, USA), set to 220 nm according to the method described by Martillotti and Puppo (1985). Ammonia samples were analyzed following the colorimetric method (Weatherburn, 1967), samples were read at 630nm on a UV-VIS spectrophotometer (Uvi Light and UVIKON XL/XS; SECOMAM, NOVA ANALYTICS Company, Ales-France).

Freeze-dried effluent samples were analyzed for DM, OM, CP, (AOAC, 2000) and PB (Makkar and Becker, 1999). Samples of PB were read at 230 nm on a UV-VIS spectrophotometer (Uvi Light and UVIKON XL/XS; SECOMAM, NOVA ANALYTICS Company, Ales, France).

Protozoa counts were performed following the procedure described by Dehority (2003).

Residue of fermentation fluid collected at the end of the trial were analyzed for DM and OM (AOAC, 2000).

2. Experiment 2.

2.2.1. Incubation conditions

The dual-flow continuous system consisted of 8x1.4l water-jacketed fermenter vessels (Teather and Sauer, 1988), filled with 700 ml of strained rumen fluid as inoculum. The rumen contents were sampled from a mature non-lactating Holstein cow, fitted with rumen cannula and fed a diet consisting of 65% roughage and 35% concentrate, and transported to the laboratory in sealed and preheated containers. In the laboratory, contents were filtered through a polyester screen (pore size 355 μm ; B & S H Thompson, Ville Mont-Royal, QC, Canada) into a large beaker and mixed thoroughly before pouring into the fermenters. The vessels were stirred continuously at a relatively slow rate (10 to 12 rpm) and continuously flushed with CO_2 at 20 ml/min, to keep an anaerobic condition. A circulating water bath was used to maintain the temperature of the fermenters at 39°C.

An artificial saliva (Slyter et al., 1966) was pumped into the vessels at 72 ml/h, giving a D of 2.40.

Experimental diets consisted of 3 forage to concentrate (F:C) ratios: high forage diet (HF; 65% forage:35% concentrate), medium forage diet (MF; 50% forage:50%concentrate), low forage diet (LF; 35% forage:65%concentrate); every diet was supplemented (+SRU) or not (-SRU) with a slow-release urea product (Optigen), included at 5.4-5.7 g/kg DM.

A total of 20 g DM of the diet was added daily in two equal portions (at 8:00 and 20:00); the fermenters of the MF diet received the first day the HF diet, and the fermenters of the LF diet received the first day the HF diet and the second day the MF diet (stabilization period). After this stabilization period, every fermenter received the diet assigned for 5 days. Data were collected on d 6 and d 7 (measuring period).

2.2.2. Sampling and analyses

On the 2 days of the measuring period, pH was monitored continuously and recorded every hour for 12 h through a pH electrode connected to a pH meter (model 63, Jenco instruments, Inc., San Diego, CA, USA). At 4, 8 and 12 h after the morning feeding, air samples were collected from the headspace gas of each fermenter using a 10 µl gastight syringe (Hamilton Co., Reno, NV, USA) and analyzed for CH₄ with a GLC (model CP-3900, Varian, Walnut Creek, CA, USA). After the CH₄ sampling, 5ml of fermentation fluid was collected from the fermenter, added to 1 ml of 3 M meta-phosphoric acid, and stored at -40°C for VFA analysis. At 2, 4, 6, 8, 10 and 12 h after the morning feeding, 5 ml of fermentation fluid of every bottle was collected, added to 1 ml of 0.18 M sulfuric acid, stored at -40°C for NH₃-N analysis.

Samples for VFA were analyzed using a GLC (model 5890, Hewlett-Packard Lab, Palo Alto, CA, USA) with a capillary column (30 m x 0.32 mm i.d., 1 µm phase thickness, Zebtron ZN-FAAP, Phenomenex, Torrance, CA, USA) and flame ionization detection. Concentrations of NH₃-N were determined with the colorimetric method as described by Rhine et al. (1998) using a plate reader (MRXe, Dynex Technologies, Chantilly, VA, USA).

The diets and the ingredients were analyzed for DM and OM concentration (AOAC International, 2000), for N concentration using an N analyzer (Flash 2000; CE Elantech Inc., Lakewood, NJ; AOAC International, 2000), for NDF and ADF concentrations using an Ankom apparatus (Ankom Technology, Macedon, NY) according to Van Soest et al.

(1991), and for ether extract (EE) using an AnkomXT20 Fat Analyzer (Ankom Technology, Macedon NY; AOAC International, 2000).

3. Calculations and statistical analysis.

The DM and OM digestibilities were calculated with the formula suggested by Hoover et al., (1976), corrected by the matter accumulation inside the vessels at the end of the trial. Purine base values were calculated according to Obispo and Dehority (1999).

Data from experiment 1 were analyzed according to a monofactorial design: $y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \gamma_k + \epsilon_{ijk}$, where: μ is the overall mean, α is the fixed effect of the fermentation run ($i=1,2$), β_j is the fixed effect of the sampling day ($j=1,3$), γ the mode of administration of the dose of urea ($k=1,4$) and ϵ_{ijk} is random error. Data of experiment 2 were analyzed according to a 3 x 2 factorial design as: $y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + (\alpha\beta)_{ij} + \epsilon_{ijk}$, where: μ is the overall mean, α is the fixed effect of the level of forages in the diet ($i=1,3$), β_j is the fixed effect of source of dietary N ($j=1,2$), and ϵ_{ijk} is random error. The Student-Newman-Keuls multiple range test was used to compare averages within the maturity stage experimental factor and significant differences were declared at $P < 0.05$ and at $P < 0.01$ and trends at $P < 0.10$.

4. Results and discussion.

Both single flow continuous cultures used in the two trials had the exit for the overflow near the bottom of the vessel, allowing the formation of a fiber mat on the fluid surface. However, the systems differ in several incubation conditions, such as D (1.29 vs 2.47), F/B (8.28 vs 28.57 g/l) and stirring settings (intermittent vs continuous).

The diets used also differed between trials, having a diet composed of corn silage (50%), dry corn (42.5%), a mineral supplement (6%), and feed-grade urea (1.5%) in the first experiment, while mixtures simulating productive diets for lactating cows were used in the second experiment. These latter diets (table 3) contained, as a forage source, corn silage and alfalfa hay (50:50), which represented 65, 50 or 35% of the diet (HF, MF and LF diets, respectively). Steam-flaked corn was included in diets to compensate the reduction of starch when corn silage was reduced. The remaining ingredients were feeds containing highly degradable fiber (corn DDGS, whole cottonseeds, shreds of beet pulp, wheat bran, soybean meal) and were included to maintain a constant level of NDF in the diets (from 28.2 to 30.6 % of DM). All diets had the same CP content (from 15.8 to 16.7

% of DM) and in each forage level, part of the soybean meal (SBM) was replaced with a commercial slow-release urea product, increasing the estimated RDP value.

In experiment 1 a slow-release urea supplement was simulated by partitioning feed-grade urea into four administrations: at each feeding (morning and afternoon) a total dose of urea was fed to one fermenter (U1) and the same dose was divided into two, three or four equal parts (U2, U3 and U4, respectively) and delivered in the other fermenters at intervals of 1 h. The pH values of fermentation fluid, measured before each administration, did not differ between treatments during the post-feeding. However, the post-feeding reduction of pH (calculated as a subtraction of the first value from the consecutive values of pH for each fermenter) allowed detecting some significant differences: 1 h after feeding the fermenters receiving the U1 dose had a lower reduction than those receiving the U4 (-0.027 vs -0.052, respectively; $P < 0.05$), while the other two administrations (U2 and U3) showed intermediate values (-0.033 and -0.041 respectively). At 2 h after feeding, there was a tendency ($P < 0.10$) for U1 to show a lower reduction of pH compared to U4 dose, while no differences were detected in the reduction 3 h after feeding (figure 1).

The difference in pH pattern after feeding the 4 ways of administration of urea (U1, U2, U3 and U4), is a consequence of the protonation of NH_3 to NH_4^+ , that results in an increase of pH values (Kertz et al., 1983). The physiological reduction of pH after the feeding is inversely proportional to the dose of urea administrated; therefore a simulation of a slow-release of urea results in a lower buffering condition in the fermenting fluid. In an *in vivo* trial, Taylor-Edwards et al. (2009) reported that ruminal ammonia concentrations were greater for beef steers dosed with urea than those dosed with a SRU product and this resulted in a higher pH values 1 and 2 h after dosing. In our *in vitro* conditions, a single dose of urea determined a reduction of pH, which was approximately half of that measured by dividing the same dose into four portions. In *in vivo* conditions, this buffering process is complicated by the absorption of ammonia and acids, which varies according to the pH conditions of the rumen for different permeability through the rumen wall and by the influx of urea through the rumen wall (Aschenbach et al., 2011).

The different mode of dosing urea in bottles had no effects on total VFA concentration of the fermentation fluid, while, among the different acids, only propionate had a tendency to be higher in bottles receiving the U1. Consequently, the acetate to propionate ratio tended ($P < 0.10$) to be lower in diets with the administration of all the urea in a single

dose. These results seem in agreement with experiments, where the rumen concentration of ammonia was increased by infusion of ammonium chloride (Song and Kennelly, 1989; Grummer et al., 1984) or ammonium bicarbonate (Song and Kennelly, 1990) and which showed a reduction of the acetate to propionate ratio. A productive trial with dairy cows (Highstreet et al., 2013) resulted in higher milk fat content from cows receiving slow-release urea than those fed with feed-grade urea which was attributed to a lower rumen ammonia concentration.

In experiment 2 the effects of substituting soybean meal with a slow-release urea product were evaluated in diets having the same amount of fiber differing in degradability. Figure 2 presents the pH variations after feeding. There were no differences in pH values between the diets at feeding time (6.30-6.50), but pH regularly decreased within the 4 h post feeding from 6.13 to 5.82 for LF diets, from 6.15 to 6.03 for MF diets and from 6.20 to 6.02 for HF diets ($P < 0.01$). The highest decline in LF diets is the result of more intense fermentation activity for these diets as can be seen by the higher total VFA production at 4 h post feeding (42.97 mM) compared to MF and HF diets (39.55 and 40.81 mM, respectively, $P = 0.03$). We did not directly measure the degradability of the diets, but the above commented results (pH and VFA) clearly indicate that LF diets have an anticipated peak of fermentation compared to the other diets. As expected, the substitution of forages with byproducts determined a reduction in acetate and an increase in propionate concentrations.

LF diets had lower concentrations of ammonia compared to MF and HF diets ($P < 0.01$); in particular at 2 h after feeding (compared to feeding time) there was an accumulation of ammonia in the fermentative liquid of the vessels fed with MF and HF diets and a decrease in LF diets ($P < 0.01$). *In vitro* and *in vivo* studies have reported that the high amount of readily fermentable carbohydrates can reduce ruminal ammonia concentrations because of improved N uptake by ruminal microbes (Bach et al., 2005). In HF and MF diets, characterized by having less rapidly degradable carbohydrates than the LF diets, ammonia concentration in the fermenting fluid remained high because it was not sequestered by the microbes, resulting in the highest pH values for these diets.

The substitution of SBM with SRU determined variation of pH and ammonia concentrations variable according to diets, with the greatest difference between LF and HF diets and the MF generally being at an intermediate level. As can be seen from figure 3, the dietary inclusion of SRU in LF diet resulted in higher ammonia concentration (5.99

vs 5.91 mg/100ml) and pH values (5.98 vs 5.88) than the LF SBM diet. On the contrary, the two HF diets showed no difference, while intermediate values were shown in the MF diet. If one considers that difference of ammonia concentration and/or the pH are the result of the bacteria uptake, these fermentation parameters can be considered as indicators of the degree of synchrony between N degradation and growth of microorganisms. Therefore, based on these parameters it seems that SRU is degraded faster than SBM and a delay in its release should improve the N usage by bacteria. In diets with more forages the difference between SRU and SBM disappears, because their fiber is slowly degraded and both the nitrogen supplements (SRU and SBM) become less synchronized with carbohydrate fermentation.

The methane yield, which is associated to the rumen acetate pathway of fermentation (Martin et al., 2010) increased with the forage in the diets ($P < 0.01$) in accordance with the described modifications of VFA fermentation (increase of acetate). The type of N source did not affect the quantity of methane.

Finally, the two experiments were deeply different for several aspects (e.g. diets, apparatus, etc.), but gave close values of total VFA concentrations. On the contrary the ratio of acetate:propionate and the rumen acidity conditions were lower in the second experiment. A possible explanation could be the different F/B ratio of the two experiments (8.28 vs 28.57 g/l for the first and second experiment respectively), because Cantalapiedra-Hijar et al. (2011) demonstrated an inverse relationship between F/B ratio and the acetate:propionate and fermentation pH values.

5. Conclusions.

Both trials showed that SFCC are suitable experimental tools to evaluate small variations in pH of fermentation fluid due to addition of urea at doses usually utilized in ruminant diets (e.g. 1.0-1.2 % DM) and in the range of rumen acidity. It was confirmed (experiment 1) that a high concentration of rumen ammonia, as consequence of urea addition, increases propionate and has the tendency for a reduction in the acetate:propionate ratio. Moreover, experiment 2 demonstrated that substituting fiber from forages with that of byproducts in diets is relevant in lowering the ammonia accumulation (for a possible increase in bacterial growth) with a reduction in buffering the rumen.

6. References.

Association of Official Analytical Chemists, 2000. Official Methods of Analysis, 16th ed. AOAC, Chemists, Gaithersburg, MD, USA.

Aschenbach, J.R. Penner, G.B. Stumpff, F. Gäbel, G., 2011. Role of fermentation acid absorption in the regulation of ruminal pH. *J. Anim. Sci.* 89, 1092-1107.

Bach, A., Calsamiglia, S., and Stern, M.D., 2005. Nitrogen metabolism in the rumen. *J. Dairy Sci.* 88, (E.suppl.) E9-E21.

Cantalapiedra-Hijar, G., Yáñez-Ruiz, D.R., Newbold, C.J., Molina-Alcaide E., 2011. The effect of the feed-to-buffer ratio on bacterial diversity and ruminal fermentation in single-flow continuous-culture fermenters. *J. Dairy Sci.* 94, 1374-1384.

Ceconi, I., Ruiz-Moreno, M. J., Di Lorenzo, N., Di Costanzo, A., Crawford, G. I., 2015. Effect of urea inclusion in diets containing dried corn distillers grains on feedlot cattle performance, carcass characteristics, ruminal fermentation, total tract digestibility, and purine derivatives-to-creatinine index. *J. Anim. Sci.*, in press.

Cherdthong, A., Wanapat, M., Wachirapakorn, C., 2011. Influence of urea–calcium mixtures as rumen slow-release feed on *in vitro* fermentation using a gas production technique. *Arch. Anim. Nutr.* 65, 242–254.

Cooke, R.F., Di Lorenzo, N., Di Costanzo, A., Yelich, J.V., Arthingto, J.D., 2009. Effects of Fermenten® supplementation to beef cattle. *Anim. Feed Sci. Techn.* 150, 163–174.

Dehority, B.A., 2003. Rumen microbiology. Nottingham University Press, Thrumpton, Nottingham.

Galo, E., Emanuele, S.M., Sniffen, C.J., White, J.H., Knapp, J.R., 2003. Effects of a polymer-coated urea product on nitrogen metabolism in lactating Holstein dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 86, 2154–2162.

Golombeski, G.L., Kalscheur, K. F. Hippen, A. R., Schingoethe, D. J. 2006. Slow-release urea and highly fermentable sugars in diets fed to lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 89, 4395–4403.

Grummer, R.R., Clark, J.H., Davis, C.L., Murphy, M.M., 1984. Effect of ruminal ammonia-Nitrogen concentration on protein degradation in situ. *J. Dairy Sci.* 67, 2294–2301.

Highstreet, A., Robinson, P.H., Robison, J., Garrett, J.G., 2013. Response of Holstein cows to replacing urea with with a slowly rumenreleased urea in a diet high in soluble crude protein. *Anim. Feed Sci. Tech.* 129, 179–185.

Holder, V.B., El-Kadi, S.W., Tricarico, J.M., Vanzant, E.S., McLeod, K.R., 2013. The effects of crude protein concentration and slow release urea on nitrogen metabolism in Holstein steers. *Arch. Anim. Nutr.* 67, 93-103.

Hoover, W.H., Crooker, B.A., Sniffen, C.J., 1976. Effects of differential solid-liquid removal rates on protozoa numbers in continuous cultures of rumen contents. *J. Anim. Sci* 43, 528–534.

Kertz, A.F., Davidson, E.L., Cords, B.R., Puch H.C., 1983. Ruminal infusion of ammonium chloride in lactating cows to determine effect of pH on ammonia trapping. *J. Dairy Sci.* 66: 2597-2601.

Martillotti, F., Puppo, P., 1985. Liquid chromatographic determination of organic acids in silages and rumen fluids. *Ann. Ist. Sper. Zootec.* 18, 1-10.

Martin, C., Morgavi, D.P., Doreau, M., 2010. Methane mitigation in ruminants: from microbe to the farm scale. *Animal* 4, 351-365.

Makkar, H.P.S., and Becker K., 1999. Purine quantification in digesta from ruminants by spectrophotometric and HPLC methods. *Brit. J. Nutr.* 81, 107-112.

McDougall, E.I., 1948. Studies on ruminant saliva. 1. The composition and output of sheep's saliva. *Biochem. J.* 43, 99-109.

Obispo, N.E., and Dehority B.A., 1999. Feasibility of using purines as a marker for ruminal bacteria. *J. Anim. Sci.* 77, 3084-3095.

Rhine E. D., Sims G. K., Mulvaney R. L., Pratt E. J., 1998. Improving the Bertholot reaction for determining ammonium in soil extracts and water. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 62, 473-480.

Slyter, L.L., Bryant, M.P., Wolin, M.J., 1966. Effect of pH on population and fermentation in a continuously cultured rumen ecosystem. *Appl. Microbiol.* 14, 573-578.

Song, M.K., Kennelly, J.J., 1989. In situ degradation of feed ingredients, fermentation pattern and microbial population as influenced by ruminal ammonia concentration. *Can. J. Anim. Sci.* 69, 999-1006.

Song, M.K., Kennelly, J.J., 1990. Ruminal fermentation pattern, bacterial population and ruminal degradation of feed ingredients as influenced by ruminal ammonia concentration. *J. Anim. Sci.* 65, 1110-1120.

Spanghero, M., Boccalon, S., Gracco, L., Gruber, L., 2003. NDF degradability of hays measured in situ and *in vitro*. *Anim. Feed Sci. Tech.* 104, 201-208.

Taylor-Edwards, C.C., Elam, N.A., Kitts, S.E., McLeod, K.R., Axe, D.E., Vanzant, E.S., Kristensen, N.B., Harmon, D.L., 2009. Influence of slow-release urea on nitrogen balance and portal-drained visceral nutrient flux in beef steers. *J. Anim. Sci.* 87, 209-221.

Teather, R.M., Sauer, F.D., 1988. A naturally compartmented rumen simulation system for the continuous culture of rumen bacteria and protozoa. *J. Dairy Sci.* 71, 666-673.

Van Soest, P.J., Robertson, J.B., Lewis, B.A., 1991. Methods of dietary fiber, neutral detergent fiber and non polysaccharides in relation to animal nutrition. *J. Dairy Sci.* 74, 3583–3597.

Weatherburn M.W., 1967. Phenol-hypochlorite reaction for determination of ammonia. *Anal.Chem.* 39, 971-974.

Xin, H.S., Schaefer, D.M., Liu, Q.P., Axe, D.E., Meng, Q.X., 2010. Effects of polyurethane coated urea supplement on *in vitro* ruminal fermentation, ammonia release dynamics and lactating performance of Holstein dairy cows fed a steam-flaked corn-based diet. *Asian-Aust. J. Anim. Sci* 23, 491–500.

Zinn, R.A., Barrajas, R., Montano, M. Ware, R. A., 2003. Influence of dietary urea level on digestive function and growth performance of cattle fed steam-flaked barley-based finishing diets, *J. Anim. Sci.* 81, 2383-2389.

Table 1. Effect of urea level on fermentation parameters of a continuous culture (pH, VFA), NDF digestibility and protozoa numbers.

	Urea levels (U) ^b				Significativity ^a		RMSE
	1	2	3	4	run	U	
pH							
- t 0	6.53	6.54	6.55	6.54	**	-	0.04
- t 1	6.50	6.51	6.51	6.49	**	-	0.04
- t 2	6.50	6.50	6.50	6.48	**	-	0.04
- t 3	6.48	6.49	6.50	6.48	**	-	0.04
- Δ t 1-0	-0.03	-0.03	-0.04	-0.05	*	*	0.02
- Δ t 2-0	-0.03	-0.04	-0.05	-0.06	**	0.05	0.03
- Δ t 3-0	-0.05	-0.05	-0.05	-0.06	-	-	0.02
Volatile fatty acids, mol/100mol							
Total VFA	37.70	35.24	34.77	35.78	**	-	5.329
Acetate	61.22	60.93	61.50	60.65	**	-	0.887
Propionate	25.04	24.68	24.17	24.30	**	-	0.830
Butyrate	9.68	10.11	9.78	10.71	**	-	1.118
Valerate	0.24	0.24	0.41	0.35	-	-	0.084
Isobutyrate	0.59	0.63	0.61	0.54	**	-	0.242
Isovalerate	3.23	3.42	3.53	3.46	**	-	0.382
Acetate/propionate	2.45	2.48	2.56	2.51	**	0.09	0.082
Digestibility, %							
OM	53.3	51.3	51.3	51.1	**	-	3.00
NDF	76.7	76.7	76.8	76.0	**	-	3.28
Protozoa, n/ml							
- Total	1.06*10 ⁵	1.01*10 ⁵	1.04*10 ⁵	1.20*10 ⁵	-	-	4.79*10 ⁴

^a **: P<0.01; *: P<0.05

^b U1: whole urea dose at feeding time; U2: urea dose split in 2 equal fractions; U3: urea dose split in 3 equal fractions; U4: urea dose split in 4 equal fractions.

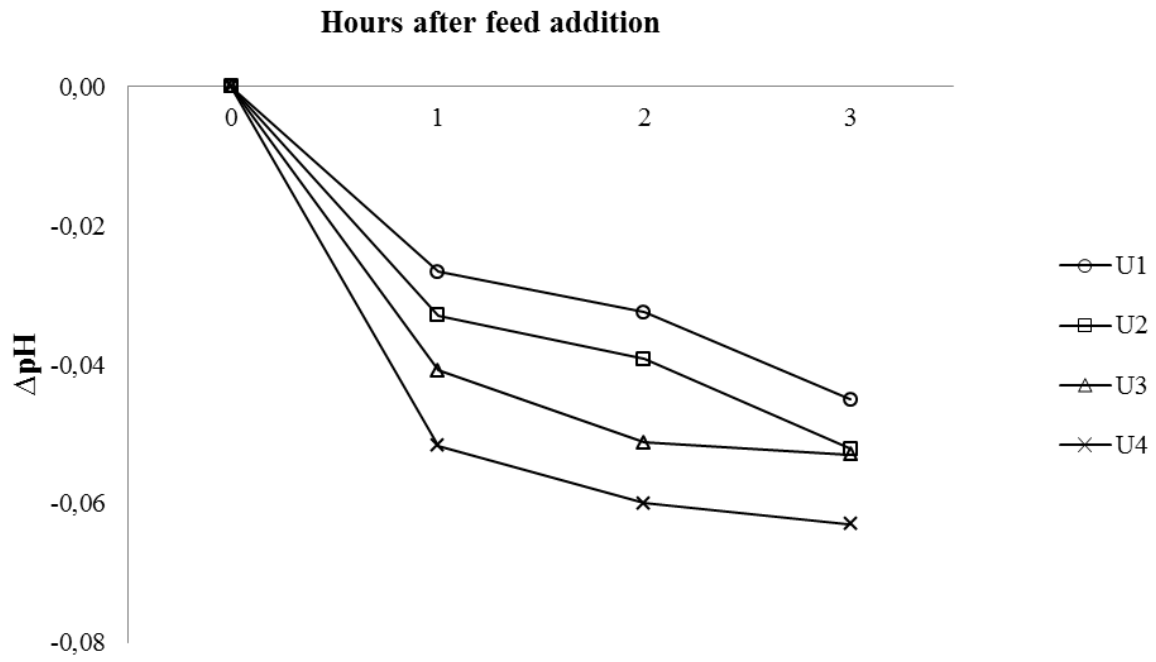


Figure 1. Effect of urea level on the pH pattern of a continuous culture after feed administration.

Table 2. Effect of urea level on nitrogen metabolism and microbial yield and efficiency of a continuous culture.

	Urea levels (U) ^f				Significativity ^e		RMSE
	1	2	3	4	run	U	
Ammonia nitrogen, mg/dL							
- t 0	4.37	3.91	4.30	4.72	-	-	1.45
- t 1	7.16	6.94	7.55	7.37	-	-	1.60
- t 2	6.85	7.54	7.13	7.06	-	-	1.32
- t 3	8.00	8.05	8.07	8.29	-	-	1.19
- Δ t 1-0	2.79	3.02	3.30	3.66	-	-	0.47
- Δ t 2-0	2.24	3.41	3.34	2.65	**	-	1.21
- Δ t 3-0	3.16 ^{AB}	3.70 ^A	3.49 ^{AB}	2.42 ^B	-	0.05	0.72
Effluent N							
- NH ₃ N (g/d)	0.03	0.03	0.03	0.02	**	-	0.01
- NH ₃ N (mg/dl)	1.50	1.64	1.46	1.22	**	-	0.33
- NAN ^a (g/d)	0.12	0.11	0.12	0.13	**	-	0.01
- DMNP ^b (g/d)	0.06	0.05	0.05	0.06	-	-	0.01
- NANMN ^c (g/d)	0.06	0.06	0.07	0.08	**	-	0.01
MOEFF ^d	9.42	9.22	9.35	9.79	**	-	1.84

^a non-ammonia nitrogen

^b daily microbial nitrogen production

^c non-ammonia non-microbial N

^d microbial efficiency expressed as grams of microbial N/Kg of organic matter truly digested

^e **: P<0.01; *: P<0.05

^f U1: whole urea dose at feeding time; U2: urea dose split in 2 equal fractions; U3: urea dose split in 3 equal fractions; U4: urea dose split in 4 equal fractions.

Table 3. Ingredients and chemical composition of the experimental diets offered to continuous cultures

Item	Experimental diets ¹					
	HF		MF		LF	
	-SRU	+SRU	-SRU	+SRU	-SRU	+SRU
Ingredients, % of DM						
Alfalfa hay	31.7	32.6	25.0	25.5	16.8	17.3
Corn silage	31.7	32.6	25.0	25.5	16.8	17.3
Steam-flake corn	19.8	20.4	25.0	25.4	30.8	31.7
Corn DDGS ²	6.34	6.12	5.57	5.77	5.29	5.44
Cottonseeds, whole	3.96	4.08	11.13	11.54	3.85	3.96
Beet pulp, shreds	0.99	1.02	-	-	7.69	7.92
Wheat bran	-	-	3.71	4.81	11.54	11.87
SBMCM ³	5.54	2.55	4.45	0.96	7.21	3.96
Optigen	-	0.57	-	0.54	-	0.55
Chemical composition, % of DM						
OM	93.0	93.0	94.0	94.0	95.0	95.0
CP	16.5	16.7	15.8	16.5	15.8	16.5
- RDP ⁴	9.59	10.11	9.65	10.07	9.66	10.06
- RUP ⁴	6.94	6.52	6.91	6.45	6.86	6.46
NDF	29.5	30.3	30.6	30.6	28.2	29.9
ADF	17.9	18.2	18.4	18.0	15.4	15.9
Ether extract	3.18	3.53	4.28	4.51	3.30	3.35
NFC ⁵	44.1	42.1	43.4	42.5	47.5	45.2
NE _L , ⁴ Mcal/kg	1.69	1.67	1.76	1.74	1.80	1.80

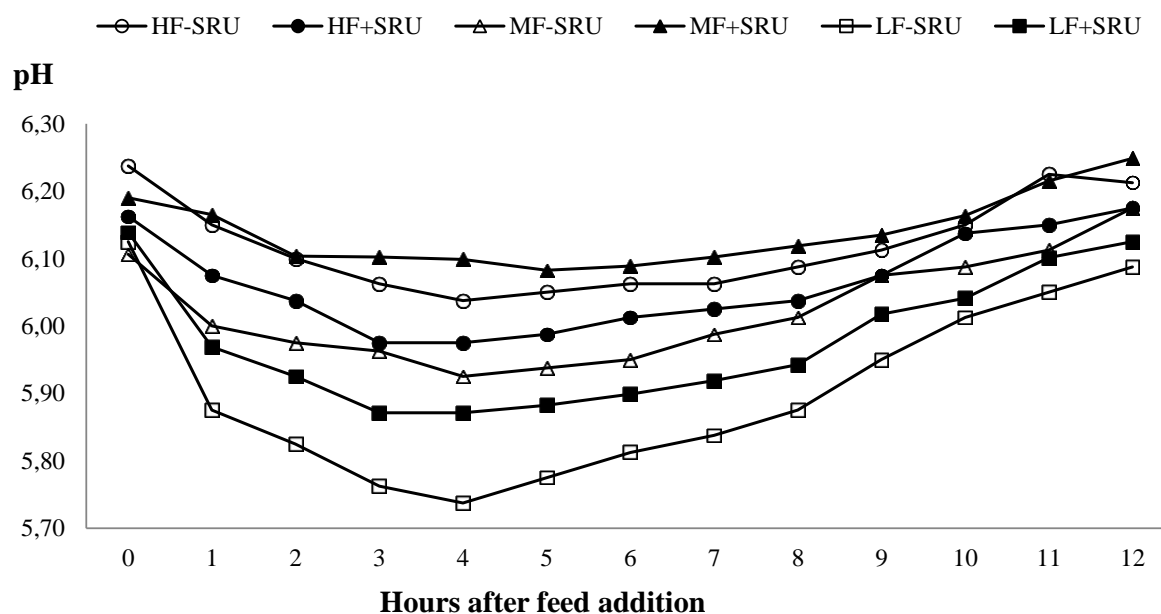
¹HF-SRU = high forage diet (HF; 65% forage) without slow-release urea (SRU); HF+SRU = HF with SRU; MF-SRU = medium forage diet (MF; 50% forage) without SRU; MF+SRU = MF with SRU; LF-SRU = low forage diet (LF; 35% forage) without SRU; and LF+SRU = LF with SRU.

²DDGS = dried distillers grains with solubles.

³Mixture of soybean meal and canola meal at 50:50 in a DM basis.

⁴Based on tabular value (NRC, 2001)

⁵NFC = 100 – CP – NDF – ether extract – ash.



Effect ¹	t0	t1	t2	t3	t4	t5	t6	t7	t8	t9	t10	t11	t12
F	-	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	0.07	<0.05	<0.05	0.08
SRU	-	0.05	-	-	<0.05	0.09	-	-	-	-	-	-	-
INT	0.10	<0.01	-	<0.05	<0.05	0.06	-	-	-	-	-	0.10	-
RMSE	0.11	0.11	0.14	0.13	0.13	0.12	0.12	0.12	0.12	0.12	0.12	0.12	0.11

¹F = forage in the diet (HF vs. MF vs. LF); SRU = supplementation of SRU (-SRU vs. +SRU); and INT = interaction between F and SRU.

Figure 2. Diurnal fluctuation of pH values in continuous cultures after addition of lactation dairy diets differing in forage-to-concentrate ratio and in the degradability of the forage source, without or with slow-release urea.

Table 4. Ruminal fermentation characteristics of continuous cultures offered lactation dairy diets differing in forage-to-concentrate ratio and in the degradability of the forage source, without or with slow-release urea.

Item	Experimental diets ¹						Significativity ²			RMSE
	HF		MF		LF		F	SRU	INT	
	-SRU	+SRU	-SRU	+SRU	-SRU	+SRU				
Ammonia nitrogen, mg/dL										
- t 0	7.66	7.87	7.16	8.49	6.12	6.83	-	-	-	1.43
- t 2	9.69	6.67	9.13	11.38	4.56	6.39	**	-	-	2.07
- t 4	8.05	7.45	5.82	8.78	3.73	5.48	**	0.07	-	1.71
- t 6	7.89	8.04	7.19	8.78	3.86	5.53	**	-	-	1.84
- t 8	6.66	7.91	6.12	8.45	4.62	6.08	0.07	0.03	-	1.76
- t 10	7.35	7.18	6.77	8.37	4.92	6.43	0.04	-	-	1.41
Methane, mM/d										
	16.0	15.3	12.0	16.4	10.2	11.4	<0.01	0.07	0.06	1.35

¹HF-SRU = high forage diet (HF; 65% forage) without slow-release urea (SRU); HF+SRU = HF with SRU; MF-SRU = medium forage diet (MF; 50% forage) without SRU; MF+SRU = MF with SRU; LF-SRU = low forage diet (LF; 35% forage) without SRU; and LF+SRU = LF with SRU.

²F = forage in the diet (HF vs. MF vs. LF); SRU = supplementation of SRU (-SRU vs. +SRU); and INT = interaction between F and SRU.

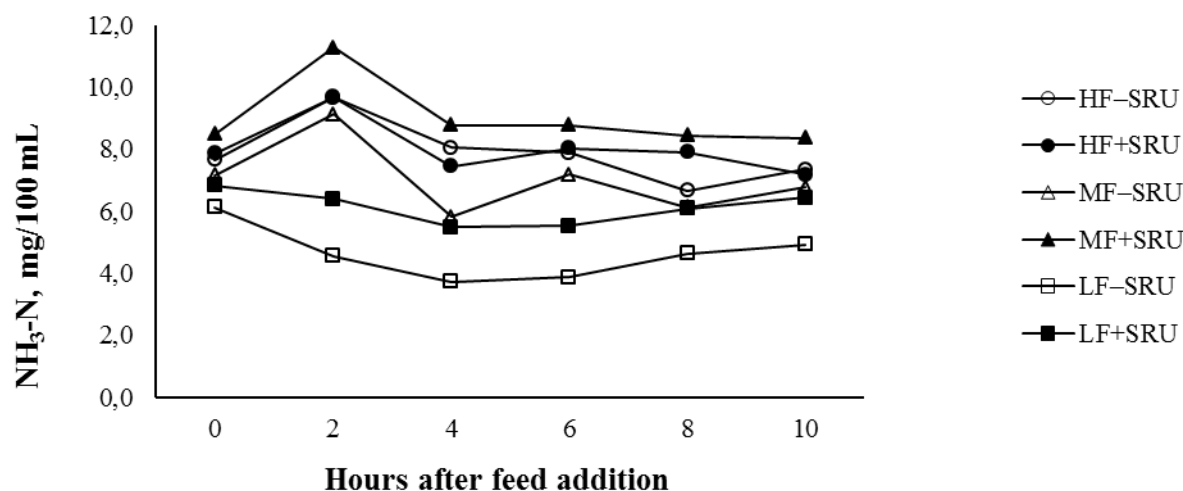


Figure 3. Diurnal fluctuation of ammonia nitrogen in continuous cultures after addition of lactation dairy diets differing in forage-to-concentrate ratio and in the degradability of the forage source, without or with slow-release urea.

Table 5. Volatile fatty acids of continuous cultures offered lactation dairy diets differing in forage-to-concentrate ratio and in the degradability of the forage source, without or with slow-release urea.

Item	Experimental diets ¹						Significativity ²			RMSE
	HF		MF		LF		F	SRU	INT	
	-SRU	+SRU	-SRU	+SRU	-SRU	+SRU				
Total VFA, mM										
h4	38.85	42.76	41.03	38.06	45.49	42.44	0.03	0.60	0.07	4.67
h8	35.39	37.14	35.44	32.42	35.42	38.99	0.29	0.50	0.06	3.98
h12	28.86	29.88	29.40	28.19	30.61	30.68	0.67	0.97	0.80	4.69
Individual VFA ³										
Acetate (A)										
h4	47.95	48.49	47.88	50.12	44.16	43.47	<0.01	0.44	0.41	3.08
h8	50.11	49.21	46.78	50.68	42.39	44.27	<0.01	0.12	0.18	3.60
h12	49.48	48.60	48.88	51.73	45.06	44.93	0.02	0.59	0.37	3.91
Propionate (P)										
h4	32.29	35.48	38.28	34.72	43.98	40.82	<0.01	0.27	0.02	3.63
h8	31.07	35.01	39.07	34.53	44.93	40.55	<0.01	0.11	<0.01	3.75
h12	32.26	35.67	37.84	34.24	43.93	40.26	<0.01	0.22	0.01	3.60
Butyrate										
h4	14.55	12.16	9.51	11.23	8.76	11.29	<0.01	0.41	0.02	2.61
h8	13.54	11.68	9.55	10.94	8.95	10.79	<0.01	0.52	0.08	2.45
h12	12.98	11.59	8.72	9.93	7.16	10.11	<0.01	0.26	0.10	2.80
Valerate										
h4	3.73	2.68	2.95	2.63	2.74	4.00	0.20	0.94	0.10	1.52
h8	3.42	2.69	3.09	2.50	3.25	3.97	0.08	0.66	0.34	1.53
h12	3.43	2.64	2.84	2.46	3.11	4.11	0.07	0.90	0.26	1.58
Isobutyrate										
h4	0.31	0.23	0.25	0.19	0.04	0.05	0.02	0.36	0.77	0.17
h8	0.27	0.28	0.23	0.12	0.07	0.00	0.01	0.27	0.63	0.17
h12	0.44	0.26	0.26	0.21	0.21	0.08	0.28	0.10	0.78	0.27
Isovalerate										
h4	1.68	0.94	1.13	1.09	0.31	0.36	<0.01	0.40	0.41	0.30
h8	1.23	1.12	1.26	1.22	0.41	0.42	<0.01	0.67	0.91	0.39
h12	1.40	1.21	1.45	1.44	0.53	0.51	<0.01	0.50	0.77	0.38
A:P										
h4	1.55	1.45	1.33	1.53	1.05	1.13	<0.01	0.30	0.12	0.20
h8	1.60	1.50	1.22	1.50	0.97	1.11	<0.01	0.07	0.03	0.19
h12	1.50	1.46	1.29	1.47	1.02	1.09	<0.01	0.22	0.26	0.19

¹HF-SRU = high forage diet (HF; 65% forage) without slow-release urea (SRU); HF+SRU = HF with SRU; MF-SRU = medium forage diet (MF; 50% forage) without SRU; MF+SRU = MF with SRU; LF-SRU = low forage diet (LF; 35% forage) without SRU; and LF+SRU = LF with SRU.

²F = forage in the diet (HF vs. MF vs. LF); SRU = supplementation of SRU (-SRU vs. +SRU); and INT = interaction between F and SRU.

Effect of increasing doses of an active dry *Saccharomyces cerevisiae* on rumen metabolism in a rumen continuous culture system.

Mason F., Zanfi C., Spanghero M.

Department of Agricultural and Environmental Sciences, University of Udine, Udine, Italy

3.4 Effect of increasing doses of an active dry *Saccharomyces cerevisiae* on rumen metabolism in a rumen continuous culture system.

Mason F., Zanfi C., Spanghero M.

Department of Agricultural and Environmental Sciences, University of Udine, Udine, Italy

1. Introduction

There is a general scientific interest in new substances that are able to positively modify rumen fermentation in terms of increased animal nutrition efficiency and the reduction of pollution agents (e.g. methane). While there are public concerns over the use of chemical additives, natural substances are mainly assumed safe. Dry yeasts are microorganism, which can survive for a limited time in the anaerobic rumen environment without colonizing it. However, their continuous administration in feeds in proper concentrations (>15 billion live yeast/g) is a widespread feeding practice in ruminant nutrition giving a positive impact on rumen microbial population.

There are several meta-analysis available which have demonstrated a stabilization of rumen pH with yeast administration (de Ondarza et al., 2010; Desnoyers et al., 2009), and an increase of milk yield and milk fat in dairy cows (Robinson and Erasmus, 2009). However, a recent meta-analysis by Poppy et al. (2012) outlined how often there is no clarity between commercial products based on active dry yeasts and yeast cultures, which can confound the experimental results. There are at least two main theories [see review by Chaucheyras-Durand et al., 2008] that try to interpret the positive action of live yeast in the rumen. The first one assumes that yeast is able to utilize the traces of oxygen dissolved in the rumen, which are toxic for the rumen anaerobic bacteria (Hungate, 1975). A second mode of action is to stimulate the growth of lactate-consuming bacteria (*M. elsdenii* and *S. ruminatum*), promoting the conversion of lactate into propionate.

Among yeast, *Saccharomyces cerevisiae* is largely used in food (baking, brewing, and distillery) and in the liquid fuel industry given its capacity to transform sugars into ethanol. Moreover it is proven as a safe product to be used as an additive in animal nutrition [Regulation (EC) No 1831/2003].

While the dietary yeast inclusion has been tested in a large number of *in vivo* trials with ruminants, including also *in situ* measurements, there are only few recent continuous

culture studies on the dietary inclusion of *Saccharomyces* (*S. boulardii*, Oeztuerk et al. 2005; *S. cerevisiae*, Newbold et al. 1998 and Oeztuerk, 2009).

The aim of the present study was to test the effects of increasing the dose of an active dry *Saccharomyces cerevisiae* on rumen metabolism in a rumen continuous culture system.

2. Material and methods.

2.1. Incubation conditions

In the present trial the incubation conditions were adopted as the previous trial (see chapter 3.3, paragraph 2.1.1 of the present thesis), with some modifications. The fermenters were supplied with a diet containing corn silage (20% DM), hay (10% DM), alfalfa hay pellet (20% DM), and a compound feed (50% DM). All the ingredients were dried, milled (1 mm screen), mixed, and 12 g/d of DM was divided into 2 equal portions and fed at 9:00 and 16:00. At each feeding time, all the fermenters received a supplement (0.025 g per feeding) consisting of a commercial yeast extract and/or soybean meal in differing ratios Y:S (0:500, Y0; 5:495, Y5; 50:450, Y50; 500:0, Y500).

2.2. Sampling and chemical analyses

From d 5 to d 7, pH of the fermenting fluid was measured with a pH meter (GLP 22, © Crison Instruments S.P.A., Spain) and recorded at each feeding time (9:00 and 16:00), and every hour after feeding for 3 hours (at 10:00, 11:00, 12:00 and at 17:00, 18:00, 19:00). At T0 (9:00 and 16:00) and T2 (11:00 and 18:00) the redox potential (Eh, in mV) was measured with a platinum electrode (50.56 probe, GLP 22, © Crison Instruments S.P.A., Spain) and was used, together with the pH values, to calculate a true index of the reducing power (rH). At the same time points (T0 and T2), samples of the fermentation liquid were collected for NH₃-N analysis (samples acidified with H₂SO₄ 1N), volatile fatty acids (VFA) analysis (samples acidified with H₂SO₄ 0.1N) and for protozoa counts. Every morning effluents were removed, the weight and volumes were recorded, and sampled [150 ml each for DM and organic matter (OM) determination and 10 ml for microbiota analysis]. At the end of the trial, effluent subsamples from the 3 sampling days were pooled together, homogenized and freeze-dried before analysis for DM and OM content. On the last day, the whole fermenting content was collected from the bottles and dried in a 60°C oven for DM and OM determinations.

The ingredients used for the diets were ground through a 1.0-mm screen (Ciclotec Tecator) and the diet mix was then analyzed for DM, OM, CP, (AOAC, 2000) and neutral detergent fiber (aNDF, Van Soest et al., 1991) using the Ankom apparatus (Ankom, Tech. Co., Fairport, NY, USA).

Samples for VFA analysis were centrifuged at $20,000 \times g$ for 30 min at 20°C. The supernatant was then filtered using polypore 0.45 µm filters (Alltech Italia, Milan, Italy) and the filtrate was injected into a high performance liquid chromatography instrument (Perkin-Elmer, Norwalk, CN, USA), set to 220 nm according to method described by Martillotti and Puppo (1985). Ammonia samples were analyzed following the colorimetric method (Weatherburn, 1967), and were read at 630nm on a UV-VIS spectrophotometer (Uvi Light and UVIKON XL/XS; SECOMAM, NOVA ANALYTICS Company, Ales-France).

Protozoa counts were performed following the procedure described by Dehority (2003). Freeze-dried effluent samples and the residues of fermentation fluid collected at the end of the trial were analyzed for DM and OM (AOAC, 2000).

2.4 Statistical analysis.

Data were analyzed with the following model: $y_{ijkl} = \mu + A_i + B_j + C_k + D_l(A*B*C)_{ijk} + E_m + \epsilon_{ijkl}$, where: μ is the overall mean, A is the fixed effect of the fermentation run ($i=1,2$), B_j is the fixed effect of the yeast inclusion ($j=1,4$), C the sampling ($k=1,2$), D is the fermentation bottle ($l=1,2$) within the (A*B*C) combination, E is the time of sampling after feeding ($m=1,2$) and ϵ is the random error.

2.5 Calculations

The DM and OM digestibility were calculated with the formula suggested by Hoover et al., (1976), corrected by the matter accumulation inside the vessels at the end of the trial.

The rH value was calculated with the Nernst's equation: $rH = E_h (mV)/30 + 2$ pH according to Marounek et al. (1987).

The counting of protozoa followed the procedure described by Dehority (2003). Protozoa were identified according to Ogimoto and Imai (1981) and categorized into 3 different groups for analysis: *Entodinium* (containing only *Entodinium* spp.), *Ophryoscolecidae* (containing Diplodiniinae and Ophryoscolecinae subfamilies) and *Holotrichs* (containing *Isotricha* spp. and *Dasytrichasp.*).

3. Results and discussion.

The stabilization of rumen pH is a common feature associated with most *in vivo* experiments evaluating the effect of dietary inclusion of dry live yeasts of *Saccharomyces cerevisiae*. In a meta-analysis including over 100 papers from *in vivo* experiments with small and large ruminants, Desnoyers et al. (2009) demonstrated an increase in the average rumen pH. In recent *in vivo* trials with dairy cows, dry yeast of *Saccharomyces cerevisiae* added to diets resulted in a limited drop in pH after feeding (Marden et al., 2008), a reduction in time of low pH levels during the day (e.g. time below pH 5.6, Thrune et al., 2010), or an increase in both the average and the lowest pH values during the day (Bach et al., 2007). In a recent *in vivo* trial with dairy cows (AlZahal et al., 2014), where sub-acute rumen acidosis was induced, the addition of dry yeast significantly reduced the time that pH was lower than 5.6 in cows affected by acute rumen acidosis. On the contrary, the addition of dry active yeast was not effective in stabilizing ruminal pH during and after an acute acidosis challenge in another *in vivo* trial (Vyas et al., 2014). In the present *in vitro* study, a stabilization of rumen pH was demonstrated in diets containing dry active *Saccharomyces cerevisiae* by measures recorded at 1 h intervals for a period of 4 h after the morning and the evening feedings (table 1). The fermentation conditions of our CC fermenter maintained a rumen pH of approximately 6.30-6.50 and the reduction in pH after feeding was quite limited and lower than those generally found *in vivo*, probably due to the high buffering capabilities of the CC system.

Moreover, pH values at the afternoon feeding resulted lower (of about -0.10) than the respective values of the morning sampling for all the diets ($P < 0.01$). This difference is the result of the different recovery times between the 2 feeding (9:00 and 16:00), being the time to raise after the morning feeding less than the time after the afternoon feeding.

However, the reduction of pH from the measurement done after feeding administration (e.g. 1, 2 and 3 h post-feeding) were greater ($P < 0.01$) in the control diet (from -0.13 to -0.15) compared with the diets supplemented with yeast (averaging from -0.08 to -0.11).

The dietary yeast addition resulted in a reduction in ammonia concentration ($P < 0.05$) with respect to the control diet. Oeztuerk et al. (2005) observed an increase of ammonia concentration with an administration of yeast, but the authors explained this increase as a result of the degradation process of the yeast protein added. In the present trial the additions to the bottles were mixtures of soya and yeast to supply the same amount of

nitrogen to the bottles. Therefore, our results support the hypothesis of a reduction of the proteolytic activity in the fermentation liquid due to the yeast, also found in another *in vitro* trial (Chaucheyras-Durand et al., 2005). As expected, after feeding, ammonia concentration raised in all the fermenters as a result of protein degradation.

The redox potential is a measure of the anaerobic status, having a normal physiological range in the rumen between -250 and -350 mV. A possible positive action of yeast is to remove the oxygen, which can enter the rumen via feed and water intake and therefore promote the growth of anaerobic microbial population. There were no significant variations of the redox potential between diets, but the calculated index of the reducing power (rH) showed a tendency ($P=0.073$) to be lower with increased yeast inclusion. However, the impact of diets on the reducing conditions appeared weak. This could be due to the limited influx of oxygen inclusion in *in vitro* conditions. Both the redox potential and rH showed a significant reduction ($P<0.01$) after feeding, agreeing with the results of another CC trial (Oeztuerk et al., 2005) where the activity of *Saccharomyces boulardii* was examined.

The total concentration of VFA (table 2) increased significantly after feeding (from 37.5 to 47.0 mMol, $P<0.001$), but was not affected by dietary treatment. However, there was an increase in total VFA of about 14.0 mM in the control diet, while the increase was lower in the other treatments (from 6.0 to 8.0 mM). This could explain the limited reduction in pH after feeding with the yeast containing diets.

Table 3 presents the concentrations and percentage distribution of the protozoa population. According to literature, the results on the effects of yeast supplementation on rumen protozoa are inconsistent (Galip, 2006). Kowali et al. (2012) supplemented live yeast to the diet of Jersey heifers and found no differences in total ciliates, but observed an increase in *Dasytricha* sp. and *Ophryoscolex* spp., a decrease in *Diplodinium* spp. and no change in *Entodinium* spp. population. Miranda et al. (1996) measured an increase of *Entodinium* spp. when supplementing yeast to diets. Newbold et al. (1998), studied how the microbial population changes with an added yeast culture in a RUSITEC, and concluded that yeast administration reduces the total number of ciliates.

In the present trial, after feeding, total ciliate number decreased for all the diets (approx. 20-30%), as a result of the decreasing number of *Entodinium* at 2 h post feeding ($P<0.001$). The decrease in the number of *Entodinium* protozoa is probably due to a migrating behavior of these ciliates inside the fermenters (e.g. movements to the rubber

mat) protecting them from the sampling, and not to a real loss of cells, since there were no difference in the numbers between morning and afternoon samplings.

Supplementing yeast to the diets resulted in lower numbers of the *Ophryoscolecidae* group compared with the control diet ($P < 0.05$) regardless of sampling time. It was hypothesized that this was probably the result of a competitive role of the yeast in colonizing plant material against this group of protozoa, which usually associates with feed particles as protection against liquid washout (Orpin, 1985).

The inclusion of yeast to the diets affected the percentage distribution of the different protozoa groups, resulting at 2 h post feeding, in lower *Entodinium* percentage for control diet compared with the other diets (83 vs 89%, $P < 0.05$). It's speculated that the higher percentage of *Entodinium* in the fermenters administered with yeast supplement could be responsible of the mitigation in the pH decrease after feeding found in the same bottles. In fact, as reported by Fonty and Chaucheyras-Durand (2006) as well, the *Entodinium* spp. engulf starch more rapidly than amylolytic bacteria, but degrade it at a slower rate, resulting in a delayed acidification of the fermenting fluid.

4. Conclusions.

In the present experiment, for several measurements, such as pH, ammonia, and some protozoa numbers, a significant difference between control and yeast inclusion treatments were detected, but there was no dose-treatment effect, even though the doses of yeast followed an exponential rate of increase. It is known that live yeast cannot colonize the rumen and therefore a continuous supply is required to counteract the dilution rate. However, in *in vitro* CC systems the yeast is able to increase its concentration. Dawson et al. (1990) demonstrated that the concentration of live yeasts of *Saccharomyces cerevisiae* in CC systems maintained stable and therefore the growth and multiplication counteracted the factors responsible of their decline (death, washout). Live yeast has been demonstrated to be highly sensitive to low pH and in our *in vitro* conditions the values of liquid fermenter pH were maintained high (above 6.3). A possible explanation of the lack of differences between yeast doses could be because of the favorable *in vitro* conditions for their survival and multiplication of the yeast (e.g. high pH values, reducing conditions, etc.) which could have favored the colonization of the fermentation bottles to a similar level, independently of the initial dose of yeast.

4. Reference.

Association of Official Analytical Chemists, 2000. Official Methods of Analysis, 16th ed. AOAC, Chemists, Gaithersburg, MD, USA.

AlZahal, O., Dionissopoulos, L., Laarman, A.H., Walker, N., McBride, B.W., 2014. Active dry *Saccharomyces cerevisiae* can alleviate the effect of subacute ruminal acidosis in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 97, 7751–7763.

Bach, A., Iglesias, C., Devant, M., 2007. Daily rumen pH pattern of loose-housed dairy cattle as affected by feeding pattern and live yeast supplementation. *Anim. Feed Sci. Tech.* 136, 146–153.

Chaucheyras-Durand, F., Masségli, S., Fonty, G., 2005. Effect 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.

De Ondarza, M.B., Sniffen, C.J., Dussert, L., Chevaux, E., Sullivan, J., Walker, N., 2010. Case study: Multiple-study analysis of the effect of live yeast on milk yield, milk component content and yield, and feed efficiency. *Professional Anim. Sci.* 26, 661–666.

Dawson, K.A., Newman, K.E., Boling, J.A., 1990. Effects of microbial supplements containing yeast and lactobacilli on roughage-fed ruminal microbial activities. *J. Anim. Sci.* 68, 3392–3398.

Dehority, B.A., 2003. Rumen microbiology. Nottingham University Press, Thrumpton, Nottingham.

Desnoyers, M., Giger-Reverdin, S., Bertin, G., Duvaux-Ponter, C., Sauvant, D., 2009. Meta-analysis of the influence of *Saccharomyces cerevisiae* supplementation on ruminal parameters and milk production of ruminants. *J. Dairy Sci.* 92, 1620–1632.

Fonty, G., and Chaucheyras-Durand, F., 2006. Effects and modes of action of live yeasts in the rumen. *Biologia* 61, 741–750.

Galip, N., 2006. Effect of supplemental yeast culture on ruminal protozoa and blood parameters in rams. *Revue de médecine vétérinaire* 157, 519-524.

Hoover, W.H., Crooker, B.A., Sniffen, C.J., 1976. Effects of differential solid-liquid removal rates on protozoa numbers in continuous cultures of rumen contents. *J. Anim. Sci.* 43, 528–534

Hungate, R.E., 1975. The rumen microbial ecosystem. *Annual Review of Ecology and Systematics* 39–66.

Kowalik, B., Skomial, J., Pajak, J.J., Taciak, M., Majewska, M., Belzecki, G., 2012. Population of ciliates, rumen fermentation indicators and biochemical parameters of blood serum in heifers fed diets supplemented with yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) preparation. *Anim. Sci. Pap. Rep.* 30, 329–338.

Marden, J.P., Julien, C., Monteils, V., Auclair, E., Moncoulon, R., Bayourthe, C., 2008. How does live yeast differ from sodium bicarbonate to stabilize ruminal pH in high-yielding dairy cows. *J. Dairy Sci.* 91, 3528–3535.

Marounek, M., Roubal, P., Bartos, S., 1987. The redox potential, rH and pH values in the gastrointestinal tract of small ruminants. *Physiol. Bohemoslov.* 31, 71-74.

Martillotti, F., and Puppo, P., 1985. Liquid chromatographic determination of organic acids in silages and rumen fluids. *Ann. Ist. Sper. Zootec.* 18, 1-10.

Miranda, R.L.A., Mendoza, M.G.D., Bárcena-Gama, J.R., González, M.S.S., Ferrara, R., Ortega, C.M.E., Cobos, P.M.A., 1996. Effect of *Saccharomyces cerevisiae* or *Aspergillus oryzae* cultures and NDF level on parameters of ruminal fermentation. *Anim. Feed Sci. Tech.* 63, 289–296.

Newbold, C.J., McIntosh, F.M., Wallace, R.J., 1998. Changes in the microbial population of a rumen-simulating fermenter in response to yeast culture. *Can. J. Anim. Sci.* 78, 241–244.

Oeztuerk, H., Schroeder, B., Beyerbach, M., Breves, G., 2005. Influence of living and autoclaved yeasts of *Saccharomyces boulardii* on *in vitro* ruminal microbial metabolism. *J. Dairy Sci.* 88, 2594–2600.

Oeztuerk, H., 2009. Effects of live and autoclaved yeast cultures on ruminal fermentation *in vitro*. *J. Anim. Feed Sci.* 18, 142-150.

Ogimoto, K., Imai, S., 1981. Atlas of Rumen Microbiology. Japan Scientific Societies Press, Tokyo.

Orpin, C.G., 1985. Association of rumen ciliate populations with plant particles *in vitro*. *Microb. Ecol.* 11, 59–69.

Poppy, G.D., Rabiee, A.R., Lean, I.J., Sanchez, W.K., Dorton, K.L., Morley, P.S., 2012. A meta-analysis of the effects of feeding yeast culture produced by anaerobic fermentation of *Saccharomyces cerevisiae* on milk production of lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 95, 6027–6041.

Robinson, P.H., Erasmus, L.J., 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. Tech.* 149, 185-198.

Throne, M., Bach, A., Ruiz-Moreno, M., Stern, M.D., Linn, J.G., 2009. Effects of *Saccharomyces cerevisiae* on ruminal pH and microbial fermentation in dairy cows. *Livest. Sci.* 124, 261–265.

Van Soest, P.J., Robertson, J.B., Lewis, B.A., 1991. Methods of dietary fiber, neutral detergent fiber and non polysaccharides in relation to animal nutrition. *J. Dairy Sci.* 74, 3583–3597.

Vyas, D., Uwizeye, A., Yang, W.Z., Beauchemin, K.A., 2014. Importance of yeast viability for reducing the effects of ruminal acidosis in beef heifers during and following an imposed acidosis challenge. *Anim. Feed Sci. Tech.* 197, 103-113.

Weatherburn M.W., 1967. Phenol-hypochlorite reaction for determination of ammonia. *Anal.Chem.* 39, 971-974.

Table1. Ruminant fermentation characteristics of continuous cultures administered with a supplement at different dose of yeast.

	Yeast supplement (Y) ^a				Sampling (S)			Significance				
	Y0	Y5	Y50	Y500	Morning	Afternoon	RSME	Y	S	T	YxT	SxT
NH₃, mg/dl												
<i>Feeding time</i>	9.11	8.58	8.20	8.41	8.10	9.05	0.77	0.018	0.108	<0.001	0.999	<0.001
<i>2 hours post feeding</i>	10.67	10.07	9.73	9.88	10.90	9.27						
pH												
<i>Feeding time</i>	6.64	6.60	6.59	6.57	6.65	6.55	0.01	0.002	<0.001	<0.001	<0.001	0.539
<i>1 hour post feeding</i>	6.51	6.52	6.51	6.48	6.55	6.46						
<i>2 hours post feeding</i>	6.50	6.50	6.50	6.46	6.54	6.44						
<i>3 hours post feeding</i>	6.48	6.49	6.49	6.45	6.52	6.43						
dpH												
<i>1 hour post feeding</i>	-0.13	-0.08	-0.08	-0.09	-0.10	-0.09	0.01	<0.001	0.799	<0.001	0.910	0.272
<i>2 hours post feeding</i>	-0.14	-0.10	-0.10	-0.11	-0.11	-0.11						
<i>3 hours post feeding</i>	-0.15	-0.11	-0.11	-0.12	-0.12	-0.12						
redox, mV												
<i>Feeding time</i>	-329.31	-333.00	-334.55	-334.85	-331.03	-334.82	4.21	0.223	0.977	<0.001	0.100	0.001
<i>2 hours post feeding</i>	-334.14	-337.65	-339.49	-339.57	-339.55	-335.87						
rH												
<i>Feeding time</i>	2.29	2.10	2.04	1.97	2.26	1.94	0.14	0.073	0.013	<0.001	0.848	0.001
<i>2 hours post feeding</i>	1.86	1.74	1.68	1.61	1.76	1.68						

^a Y0: 500 mg of soybean meal; Y5: 5 mg of dry yeast plus 495 mg of soybean meal; Y50: 50 mg of dry yeast plus 450 mg of soybean meal; Y500: 500 mg of dry yeast.

^b RMSE: Root Mean Square Error

Table2. VFA concentrations of continuous cultures administered with a supplement at different dose of yeast.

	Yeast supplement (Y) ^a				RSME ^b	Significance		
	Y0	Y5	Y50	Y500		Y	T	YxT
Total VFA, mM								
<i>Feeding time</i>	35.58	37.20	37.88	39.46	5.10	0.919	<0.001	0.662
<i>2 hours post feeding</i>	48.97	45.73	46.27	46.98				
Individual, mol/100mol								
Acetate (A)								
<i>Feeding time</i>	62.91	63.25	64.99	62.62	4.44	0.863	0.426	0.967
<i>2 hours post feeding</i>	65.39	64.28	65.28	63.99				
Propionate (P)								
<i>Feeding time</i>	23.18	22.48	22.76	23.12	4.29	0.999	0.187	0.989
<i>2 hours post feeding</i>	20.48	20.82	21.19	20.55				
Butyrate								
<i>Feeding time</i>	10.87	10.94	9.62	10.83	1.24	0.448	0.019	0.838
<i>2 hours post feeding</i>	9.22	9.67	9.08	9.54				
Valerate								
<i>Feeding time</i>	0.95	1.33	0.70	1.47	0.76	0.095	<0.001	0.905
<i>2 hours post feeding</i>	3.32	3.51	2.75	4.05				
Isovalerate								
<i>Feeding time</i>	2.09	2.00	1.93	1.96	0.31	0.918	0.028	0.620
<i>2 hours post feeding</i>	1.58	1.71	1.69	1.87				
A:P								
<i>Feeding time</i>	2.75	2.87	2.91	2.73	0.82	0.997	0.149	0.985
<i>2 hours post feeding</i>	3.28	3.18	3.28	3.30				

^a Y0: 500 mg of soybean meal; Y5: 5 mg of dry yeast plus 495 mg of soybean meal; Y50: 50 mg of dry yeast plus 450 mg of soybean meal; Y500: 500 mg of dry yeast.

^b RMSE: Root Mean Square Error

Table3. Concentrations ($n \cdot 10^3/\text{ml}$) and percentage distribution (%) of the protozoa population in continuous cultures administered with a supplement at different dose of yeast.

	Yeast supplement (Y) ^a				Sampling (S)		RSME	Significance				
	Y0	Y5	Y50	Y500	Morning	Afternoon		Y	S	T	YxT	SxT
Total												
<i>Feeding time</i>	144.40	98.60	105.80	113.60	121.30	109.90	27.41	0.288	0.651	<0.001	0.170	0.409
<i>2 hours post feeding</i>	90.20	70.60	85.80	102.00	87.10	87.20						
Entodinium												
<i>Feeding time</i>	129.60	88.20	93.60	103.40	108.90	98.50	25.56	0.375	0.627	<0.001	0.107	0.450
<i>2 hours post feeding</i>	75.20	64.40	78.20	90.60	77.40	76.80						
Ophryoscolecidae												
<i>Feeding time</i>	12.00	8.60	8.40	8.40	9.20	8.50	4.09	0.031	0.883	0.215	0.367	0.923
<i>2 hours post feeding</i>	12.60	4.40	6.80	8.40	8.00	8.10						
Holotrichs												
<i>Feeding time</i>	2.80	1.80	3.80	1.80	3.20	1.90	2.05	0.527	0.379	0.292	0.049	0.075
<i>2 hours post feeding</i>	2.40	1.80	0.80	3.00	1.70	2.30						
Percentage												
Entodinium												
<i>Feeding time</i>	89.48	89.22	88.68	90.96	89.44	89.72	3.98	0.035	0.923	0.365	0.012	0.856
<i>2 hours post feeding</i>	83.18	91.10	91.45	88.94	88.71	88.63						

Ophryoscolecidae

<i>Feeding time</i>	7.36	8.12	7.36	7.08	7.51	7.45	3.49	0.013	0.415	0.204	0.014	0.517
<i>2 hours post feeding</i>	13.54	5.72	7.54	7.67	9.22	8.01						

Holotrichs

<i>Feeding time</i>	3.16	2.65	3.96	1.97	3.04	2.82	2.64	0.765	0.306	0.739	0.127	0.262
<i>2 hours post feeding</i>	3.28	3.17	1.00	3.39	2.07	3.36						

^a Y0: 500 mg of soybean meal; Y5: 5 mg of dry yeast plus 495 mg of soybean meal; Y50: 50 mg of dry yeast plus 450 mg of soybean meal; Y500: 500 mg of dry yeast

^b RMSE: Root Mean Square Error

4 Commenti e conclusioni

- L'analisi della letteratura ha messo in luce come i diversi sistemi di fermentazione ruminale in continuo, maggiormente utilizzati ai giorni nostri, abbiano da un punto di vista strutturale delle caratteristiche comuni (vaso di fermentazione di forma circolare, mantenimento della temperatura di incubazione, etc.) e dei caratteri distintivi (posizione e struttura del tubo di uscita per il materiale liquido e solido, capacità di trattenere i gas di fermentazione, tipologia del dispositivo di miscelazione, impostazioni di incubazione, etc.). Nonostante la diversità di design dei vari CC, esiste una base comune di parametri di fermentazione analizzati nelle prove con i sistemi di fermentazione in continuo (pH, VFA, NH₃, N-Flow, digeribilità di DM, OM e NDF) ed allo stesso tempo parametri analizzati solo in funzione alle tesi sperimentali (per es. biodiversità della popolazione microbica ruminale in risposta alla somministrazione di estratti naturali, misura del potenziale di ossidoriduzione dopo la somministrazione di un agente riducente) o in quanto permessi da una specifica strutturale del sistema (per es. analisi dei gas di fermentazione in condizioni di tenuta ermetica del sistema).
- Sulla base dei dati raccolti della letteratura, è stato progettato e costruito un sistema di fermentazione in continuo a singola uscita (SFCC), mantenendo l'obiettivo di semplicità di design ed utilizzo di materiali economici. La funzionalità e la struttura del sistema permettono l'analisi e la misura dei comuni parametri di fermentazione dei CC (pH, VFA, NH₃, digeribilità di DM e OM) e della popolazione microbica ruminale (popolazione batterica e protozoaria).
- Le prove di settaggio del rumine artificiale avevano l'obiettivo di identificare le impostazioni di incubazione adatte al sistema stesso. Alla luce di queste, si possono evidenziare punti deboli e di forza del sistema. Rispetto ai modelli di SFCC riportati in letteratura, il volume di fermentazione utilizzato (~1450 ml) risulta maggiore della media (1026 ± 377 ml), con un volume di inoculo iniziale per bottiglia (400 ml) inferiore alla media (932 ± 397 ml). L'impiego di volumi di fermentazione elevati deriva dalla scelta di vasi di fermentazione di capacità elevata (2 L), idonei per l'accumulo dei gas di fermentazione e non creare aumenti

di pressione all'interno del vaso di fermentazione stesso. L'applicazione di un rapporto inoculo/volume piuttosto basso (20-30%) ha cercato invece di simulare quello che viene generalmente utilizzato nei sistemi discontinui, nei quali si assume che il potere fermentante ottenuto con tali diluizioni sia comunque sufficiente per valutare in brevi tempi (24-48 h) la degradabilità ruminale. Durante le prove sperimentali, all'interno del vaso di fermentazione si accumula sostanza secca (prevalentemente alimento non o parzialmente digerito e cellule microbiche morte), situazione comune ai diversi sistemi di fermentazione in continuo. L'adozione di un basso rapporto F/B (8,28 g/L al giorno) in questo sistema ha permesso di raggiungere una situazione accettabile dal punto di vista dell'accumulo all'interno della bottiglia (< 5% dell'alimento introdotto al giorno). In questo modo è stato evitato l'intasamento del sistema, l'eccessiva densità del liquido di fermentazione e il calcolo del bilancio materiale del sistema ha richiesto una correzione minima per le quantità accumulate. Inoltre, il basso tasso di accumulo conseguente al valore di F/B adottato, ha permesso di impostare la miscelazione del liquido di fermentazione ad intervalli di tempo, favorendo la sopravvivenza della popolazione protozoaria per tutta la durata di incubazione. Infatti, una miscelazione continua ed energica del liquido di fermentazione potrebbe favorire il flusso di sostanza secca, riducendo l'accumulo dentro la bottiglia di fermentazione, ma avrebbe effetti negativi sulla popolazione dei protozoi ruminali. Queste condizioni di incubazione hanno permesso di conseguire una stima della popolazione totale di protozoi all'interno del vaso di fermentazione, e delle diverse famiglie che la compongono.

- Le prove sperimentali descritte nei paragrafi 3.3 e 3.4, che hanno rappresentato le prime applicazioni pratiche del sistema, hanno consentito di rilevare una discreta sensibilità del CC e quindi di misurare variazioni significative dei parametri di fermentazione in risposta alle tesi sperimentali.

La prima prova ha dimostrato che entrambi i sistemi di fermentazione utilizzati (SFCC) hanno permesso la rilevazione di cambiamenti anche minimi del pH del liquido di fermentazione dovuti alla somministrazione dell'urea. Nell'esperimento 1 è stato confermato un effetto delle alte concentrazioni di ammoniaca, dovute alla somministrazione di urea, sulla produzione di acido propionico, con una conseguente riduzione del rapporto acetato:propionato. Inoltre, nell'esperimento 2

l'utilizzo di sottoprodotti con fibra ad alta degradabilità nelle diete ha portato, dopo la somministrazione di urea slow release, ad un ridotto accumulo di ammoniaca nel liquido di fermentazione.

I risultati della seconda prova hanno evidenziato un effetto significativo della somministrazione di lievito su diversi parametri di fermentazione (ridotto calo di pH dopo la somministrazione di alimento, diminuzione della concentrazione di ammoniaca nel liquido di fermentazione, variazioni della popolazione protozoaria).

In generale, le applicazioni sperimentali del sistema hanno fatto rilevare una forte differenziazione tra alcuni parametri fermentativi in termini di variabilità e quindi di precisione di rilevamento. Infatti, per quanto attiene al pH le variazioni rilevate a diverse ore dal pasto sono state di entità molto ridotta (variazioni da 0.03 a 0.06 punti pH, nella seconda prova variazioni da 0.8 a 0.13 punti pH). Inoltre hanno mantenuto una variabilità sperimentale molto bassa facendo emergere differenze significative tra i trattamenti sperimentali. Per contro, altri parametri (come la concentrazione della popolazione protozoaria) sono soggetti ad un'alta variabilità intrinseca, e richiedono quindi un alto numero di campioni per individuare differenze significative dovute alle tesi sperimentali. È probabile che l'adozione di un basso valore di F/B porti ad altrettanto basse risposte degli output di fermentazione ruminale direttamente ad esso correlati; questo potrebbe rendere difficile l'interpretazione dei risultati, e la loro contestualizzazione in merito alle tesi sperimentali esaminate.

Emerge quindi la necessità di una scelta attentamente calibrata delle impostazioni di incubazione (ad es. D, volume di inoculo, F/B) e dei protocolli di campionamento, al fine di massimizzare l'intensità degli output e l'efficienza di risposta dei parametri analizzati e indirizzare la scelta a favore di quelli in grado di esprimere maggiormente gli effetti delle tesi sperimentali esaminate.

In queste prime prove con il CC, sono stati analizzati principalmente i parametri fermentativi di base (pH, VFA, NH₃, digeribilità), con l'obiettivo prossimo di integrare queste analisi con l'applicazione di tecniche di biologia molecolare per approfondire lo studio della popolazione microbica ruminale e i cambiamenti della stessa in risposta ai trattamenti sperimentali utilizzati.

- Per quanto riguarda le prospettive di miglioramento tecnico del sistema va ricordato che il fermentatore è stato progettato adottando criteri improntati alla massima semplicità ed economicità delle attrezzature e della gestione. Tuttavia, il sistema, in base alle necessità, ha ampi margini di miglioramento sotto il profilo della automazione e rilievo dei dati. Tra le diverse opzioni di miglioramento quelle che appaiono più urgenti sono un impianto automatizzato di alimentazione e un sistema di misurazione in continuo del pH con registrazione in automatico dei valori. Esistono sul mercato delle apparecchiature che possono essere facilmente adattate al sistema e che potranno fornire dei sicuri vantaggi in termini di riduzione della richiesta di manodopera (alimentazione automatizzata) ed anche per aumentare il controllo delle condizioni operative del sistema (misura in continuo del pH). Un'ulteriore evoluzione potrebbe poi derivare da un impianto di raccolta dei gas di fermentazione per studi principalmente rivolti alle emissioni di metano, ma questo miglioramento è probabilmente più complesso dal punto di vista tecnico per la necessità di mantenere a tenuta ermetica i vasi di fermentazione.
- I sistemi di fermentazione in continuo sono stati progettati e vengono esclusivamente utilizzati per la conduzione di sperimentazioni di metabolismo ruminale e non è noto all'autore nessun impiego alternativo. Tuttavia, il CC consente di disporre per un arco temporale discreto (almeno 2 settimane) di un liquido di fermentazione ruminale di caratteristiche sufficientemente costanti e in volumi rilevanti (circa 8 litri con il presente fermentatore). Il sistema di fermentazione in continuo potrebbe quindi consentire ai laboratori che non allevano animali di disporre di un inoculo per la conduzione di prove di fermentazione *in vitro* di tipo discontinuo (Daisy, Gas test, Tille e Terry, etc.). Questo permetterebbe di disporre di un inoculo per diversi cicli di fermentazione con il vantaggio d'attenuare in maniera molto rilevante la variabilità tra "run" (importante fonte di errore nelle sperimentazioni). L'inoculo ruminale ottenuto dal CC sarebbe un liquido di fermentazione caratterizzato probabilmente da una concentrazione microbica inferiore rispetto a quello appena prelevato dall'animale; per questo motivo sarebbe forse necessario impiegarlo con una diluizione molto minore rispetto a quella richiesta nelle metodiche di incubazione *in vitro* con i sistemi discontinui. Un'altra modalità di impiego alternativa del

fermentatore potrebbe riguardare la misura dell'NDF indegradabile (iNDF), parametro molto usato in alcuni sistemi di valutazione degli alimenti per ruminanti (sistemi scandinavi) oppure come marker endogeno di stima della digeribilità. Questo metodo di determinazione della digeribilità si basa sull'incubazione di nylon bags per un periodo molto lungo (288 h); in condizioni *in vitro* con sistemi discontinui sarebbe necessario quindi un numero elevato di prove per raggiungere le ore richieste dal processo di degradazione, mentre con un sistema in continuo si potrebbe ridurre il numero di incubazioni e le necessità operative.

- La messa a punto del fermentatore in continuo è stata principalmente dettata dall'esigenza di disporre di procedure sperimentali alternative all'impiego di animali vivi nella sperimentazione in nutrizione dei ruminanti. Per gli studi di metabolismo ruminale, la bovina con cannula rappresenta l'unità sperimentale d'indagine più diffusa e accurata. L'utilizzo di questi animali è stato fondamentale per le misure di degradazione ruminale, in particolare negli anni 80 e 90, fornendo le basi dei moderni sistemi di valutazione nutrizionale degli alimenti per ruminanti (sistemi INRA, NRC, Olandese). La disponibilità della cannula ha permesso studi sul transito ruminale tramite l'impiego di marker, sull'assorbimento ruminale e sulle dinamiche di produzione dei metaboliti di fermentazione. Gli studi di metabolismo ruminale in vivo non possono essere sostituiti dagli studi *in vitro* con i sistemi di fermentazione in continuo, in quanto questi ultimi presentano dei limiti. Tuttavia, in alcuni campi d'indagine (ad es. studio degli effetti della somministrazione di additivi sulla fermentazione e sulla popolazione microbica ruminale) i CC hanno i requisiti necessari per una sperimentazione *in vitro* che attenua l'esigenza di disporre di animali ai fini sperimentali. La condizione *in vitro*, inoltre, permette di operare in condizioni sperimentali che in vivo risulterebbero dannose per l'animale (ad es. somministrazione di additivi a dosi risultanti tossiche, o l'induzione di condizioni metaboliche anomale, come per esempio l'acidosi, etc.).

Nella presente tesi, i risultati ottenuti con il sistema di fermentazione in continuo, sviluppato presso il laboratorio di nutrizione animale dell'Università degli studi di Udine, sono derivati da sperimentazioni che hanno esulato completamente dall'impiego di animali donatori (con cannula ruminale o sonda esofagea). Le

condizioni sperimentali adottate sono quindi in linea con la sempre maggior consapevolezza e coscienza pubblica riguardo il benessere animale, che impongono di ridurre al minimo l'impiego di animali nelle sperimentazioni: le nostre prove condotte con il fermentatore continuo potrebbero fregiarsi quindi di un marchio "cruelty-free".